

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

par

Danielle CAVARD

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences

Sujet de la Thèse :

CONTRIBUTIONS A L'ÉTUDE DU MODE D'ACTION
DES COLICINES

soutenue le 24 juin 1970 devant la Commission d'Examen :

MM. D.-G. DERVICHIAN, Président

F. GROS, Rapporteur

J. POLONOVSKI, Examineur

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

Présentée à la
FACULTE des SCIENCES
de PARIS

par

Danielle CAVARD

pour obtenir le grade

de

Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : " Contributions à l'étude du mode d'action des colicines "

soutenue le 24 JUIN 1970 , devant la Commission d'Examen

MM. DG DERVICHIAN , Président
F. GROS , Examineur
J. POLONOVSKI, "
E. BARBU , "

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES NATURELLES

Présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES

de PARIS

1912

Par M. GAYARD



pour obtenir le grade

de

Docteur en Sciences

Le 15 Mars 1912

Sujet de la Thèse : Contribution à l'étude du rôle des algues marines dans la formation des rochers.

Le 15 Mars 1912, devant la Commission d'Examen

M. DE GROOT, Président

M. DE VRIES, Rapporteur

M. DE VRIES, Rapporteur

M. DE VRIES, Rapporteur

A mes parents.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550208_0029

Cette thèse a été préparée au C.H.U St Antoine, dans le service de Biochimie. Qu'il me soit permis d'exprimer ma respectueuse gratitude à Monsieur Jacques POLONOVSKI, Professeur de Biochimie à la Faculté de Médecine de Paris, Chef de service de Biochimie du C.H.U. St Antoine.

Ma reconnaissance s'adresse particulièrement à Monsieur le Docteur Emmanouël BARBU, Directeur de recherches au C.N.R.S., qui m'accueillit dans son laboratoire, m'initia à la recherche et guida mon travail de ses excellents conseils et de ses encouragements. Mes remerciements vont également à ses collaborateurs qui ont contribué à créer l'atmosphère de travail qui règne dans ce laboratoire et particulièrement à Madame Josiane MAROTEL-SCHIRMANN, attachée de recherches au C.N.R.S. et à Monsieur le Docteur Claude RAMPINI, Maître de conférences au C.H.U. St Antoine.

Monsieur François GROS, Professeur de Biologie moléculaire à la Faculté des Sciences de Paris a bien voulu s'intéresser à mon travail, je le prie de croire à ma profonde gratitude.

Monsieur D.G. DERVICHIAN, Professeur de Biophysique à la Faculté des Sciences de Paris m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, et je l'en remercie sincèrement.

Je remercie Monsieur Roger BELLON, Directeur du Laboratoire Roger BELLON, sans lequel ce travail n'aurait pu se faire, de l'intérêt et de la confiance qu'il a marqués pour ma carrière scientifique. Je remercie également Monsieur Yvon DARROIS, Monsieur André NAU et Monsieur André CHARRA pour les encouragements qu'ils m'ont apportés. Je tiens à rendre hommage à la mémoire de Monsieur Maurice KIEFFER, Directeur de l'usine de MONTS du Laboratoire Roger BELLON où j'ai travaillé pendant cinq ans avant d'entreprendre ces recherches, pour les conseils et l'intérêt bienveillant qu'il m'avait accordés.

"...Ô danger des mots à la dérive
Dans la limaille d'ombre il faudrait un aimant
Et la forêt s'étoile et devient firmament
Dans la vigne des nuits il monte un chant de grive "

Aragon

INTRODUCTION

La découverte de Gratia en 1925 d'une substance produite par *Escherichia coli* V et létale pour *Escherichia coli* est le point de départ de nombreuses recherches. Elle ne suscita pourtant quelque intérêt que lorsque Gratia et Frédéricq (1946) montrèrent que d'autres *E. coli* produisaient également des " principes " létaux pour différentes souches d'*E. coli*. Ils donnèrent le nom de colicine à ces substances antibiotiques produites par diverses souches de *E. coli*.

Les deux principaux problèmes posés par l'étude des colicines concernèrent leur spécificité d'action et leur nature chimique.

La spécificité d'action extrêmement variée (certaines souches sont sensibles à toutes les colicines, d'autres à quelques-unes , d'autres enfin à une seule colicine), mais toujours limitée aux souches d'*Enterobactériacées* conduisirent Gratia (1932) et Frédéricq et Gratia (1949) à comparer l'action des colicines à celle des bactériophages. Bordet (1948) et Bordet et Beumer (1948) montrèrent que l'action des colicines dépend de la présence de récepteurs de fixation, analogues à ceux des phages, situés à la surface des bactéries sensibles. Certaines colicines et certaines phages utilisent le même récepteur de fixation : ainsi la colicine K et le phage T 6, les colicines E et le phage BF 23 (Frédéricq, 1949).

Une bactérie sensible peut perdre par mutation le récepteur d'une colicine : elle devient alors résistante à cette colicine. L'étude de ces mutants permet de classer les colicines d'après leurs récepteurs de fixation (Fredericq 1946). Chaque récepteur est désigné par une lettre de l'alphabet ; cette lettre est également attribuée à la colicine se fixant spécifiquement sur le récepteur : ainsi sur le récepteur A vient se fixer la colicine A , sur le récepteur E les trois colicines E1, E2 et E3. Les bactéries productrices de colicine, dites colicinogènes, peuvent posséder le récepteur de leur propre colicine, mais elles sont résistantes à son action : elles sont dites "immunes" (Fredericq, 1948) .

La nature chimique des colicines resta longtemps discutée. Les colicines sont antigéniques, sensibles aux enzymes protéolytiques, diffusibles en gélose. Certaines sont très résistantes à la chaleur. Goebel et coll. (1955) montrèrent que la colicine K est une protéine liée à l'antigène O des bactéries productrices. Dandeu et Barbu (1967 a, 1967 b, 1968) arrivèrent à séparer la colicine K de l'antigène O : ils mirent en évidence la nature protéinique de plusieurs colicines. Herschman et Helinski (1967) obtinrent également les colicines E2 et E3 à l'état de protéines pures.

Ce furent Jacob, Siminovitch et Wollman en 1952 qui firent les découvertes capitales pour l'étude des colicines. Ces auteurs mirent en évidence :

- l'action type " coup unique " des colicines
- l'action des colicines sur les synthèses des acides nucléiques et des protéines de la bactérie sensible.
- la production létale de colicine par les bactéries colicinogènes, production inductible dans les mêmes conditions que celle des phages par les bactéries lysogènes.
- la présence d'un épissome : le facteur colicinogène, gouvernant la production de colicine et l'immunité des bactéries productrices à la colicine qu'elles peuvent synthétiser.

Nomura (1963, 1965) mit l'accent sur l'intérêt et la complexité du mode d'action des colicines . Il montra que la colicine reste présente à la surface de la bactérie ; il trouva que les premières étapes de son action sont réversibles par la trypsine ; il isola, en même temps que différents chercheurs, (Clowes 1965, Reeves 1966, Rampini et coll. 1967 , Hill et Holland 1967 , Nagel de Zwaig et Luria 1967) des mutants " tolérants " aux colicines, c'est-à-dire des mutants qui sont insensibles à l'action d'une colicine par perte ou transformation d'un caractère héréditaire, mais non par perte du récepteur de fixation de cette colicine .

Ainsi tous les problèmes relatifs au mode d'action des colicines étaient posés. Ils concernent les mécanismes - clé de la cellule et surtout les activités de contrôle de la membrane. Aussi, l'étude du mode d'action des colicines suscite-t-elle actuellement beaucoup d'intérêt.

Lorsque nous avons entrepris ce travail, Nomura (1964) avait proposé une hypothèse expliquant le mode d'action des colicines. Grâce à ses recherches et à celles de différents auteurs, il proposa la notion de " cible biochimique létale ", notion par laquelle il entend la réaction biochimique responsable de la mort de la bactérie sensible. Par exemple , pour les colicines K et E_1 , la cible biochimique serait l'arrêt des oxydations phosphorylantes ; pour la colicine E_2 : la dégradation de l'ADN ; pour la colicine E_3 : l'arrêt des synthèses protéiques. Nomura suppose qu'il y a transmission d'un signal biochimique à partir du récepteur sur lequel s'est fixé la colicine jusqu'à la " cible " de la dite colicine.

Aussi avons-nous voulu étudier les événements provoqués par la colicine avant l'apparition de ces processus biochimiques létaux. Ces événements doivent avoir lieu dans la membrane cytoplasmique de la bactérie, la colicine restant fixée sur son récepteur. Ainsi , après avoir étudié les modalités de la fixation des différentes colicines, nous sommes-nous préoccupés de savoir si le métabolisme des phospholipides n'était pas transformé sous l'action des colicines. Les phospholipides sont des constituants importants de la membrane : ils représentent jusqu'à 30% du matériel des membranes et parois des bactéries gram-négatif (Kates, 1964). Leur hydrophobie, leur point de fusion élevé et le caractère tensio-actif de certains d'entre eux doit jouer un rôle

capital dans les activités de la membrane cytoplasmique. Ensuite, cherchant à savoir si les transformations de ces phospholipides étaient dûes à l'action *primum movens* des colicines, nous les avons comparées aux transformations provoquées par d'autres facteurs agissant sur la membrane bactérienne.

Les principales fonctions de la membrane étant la perméation et la respiration, nous les avons étudiées sous l'action des colicines. Enfin , nous avons cherché si , par des traitements physiques ou chimiques , nous pouvions sauver des bactéries sensibles de l'action des colicines.

CHAPITRE I

MATERIEL & METHODES

I - Souches bactériennes

Les souches bactériennes : *E. coli* K12 1000 , *E. coli* K12 3000, *E. coli* φ Gratia, *E. coli* Bordet , sont sensibles à toutes les colicines , mais à des degrés différents.

Les souches colicinogènes sont *E. coli* K12 TR 7 (Col K), *E. coli* 235 (colK), *E. coli* ML 30 (Col E₁), *E. coli* 125 (Col E₂), *E. coli* 137 (Col E₂), *E. coli* 124 (Col E₃), *E. coli* 10 (Col H), *E. coli* (Col Q), *E. freundii* CA 31 (Col A³).

Toutes les souches nous ont été données par M.Y. Hamon (Institut Pasteur , Paris), sauf la souche sensible K12 3000 qui provient de la collection de M.M. Monod et Jacob (Institut Pasteur).

II - Milieux de culture

L'eau peptonée à 3% a été utilisée pour la mise au point d'une méthode de dosage des colicines.

Le milieu Tryptose Difco à 1 ou 0,5% a été le plus couramment employé.

Le milieu synthétique utilisé contient pour 1 litre d'eau :
 Na_2HPO_4 25,1 g; $\text{K H}_2\text{PO}_4$ 4,08 g; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 g; thiamine 0,001 g; glucose 2 g.

IV - Colicines -

Les colicines utilisées sont soit totalement soit partiellement purifiées par les méthodes mises au point par Dandeu et Barbu (1967 a, 1967 b, 1968).

V - Méthodes d'extraction et de purification des Phospholipides bactériens -

1) Extraction

La culture bactérienne marquée au ^{32}P , est centrifugée et lavée à froid en tampon Tris pH 7,2 ou en eau physiologique. Trois extractions successives sont faites sur le culot de centrifugation de la culture. La première est réalisée avec du méthanol; la suspension obtenue est dispersée, pendant 30 à 60 secondes, à l'aide d'un ultra-thurax. Les deux autres extractions sont faites avec un mélange chloroforme-méthanol 1-2 vol/vol. Toutes ces extractions sont faites à la température du laboratoire, les bactéries étant laissées 30 à 60 mn. en contact avec chaque mélange solvant. Les extraits sont recueillis par centrifugation, réunis, évaporés sous vide.

2) Lavage

Les lipides sont dissous dans un mélange chloroforme-méthanol eau 3-4-1 vol/vol. On obtient alors une seule phase; on ajoute 14 volumes de chloroforme; la démixion en 2 phases se fait en 2 à 3 h. à la température de la pièce. Après séparation des 2 phases, la phase solvant est évaporée sous vide et les lipides sont dissous dans un mélange chloroforme-méthanol 4-1 vol/vol..

3) Chromatographie des phospholipides

Les lipides sont chromatographiés sur gel de silice en couche mince à l'aide d'un solvant neutre : chloroforme-méthanol-eau 65-25-4 vol/vol. Les couches minces de gel de silice sont soit préparées au laboratoire, soit trouvées dans le commerce (Kodak, Eastman chromatogram K 301 V Silice).

L'emplacement de chaque phospholipide est révélé par autoradiographie, les phospholipides étant extraits de bactéries cultivées en présence de ^{32}P . La radioactivité de chaque phospholipide est ensuite évaluée, après élution du gel de silice, au compteur Mesco.

VI - Préparation des sphéroplastes.

Les sphéroplastes sont obtenus , à partir des bactéries E. coli K12 3000 , après action du versène 0,01 M et du lysozyme 0,1 mg/ml, 30 mn à 37°C, en tampon Tris 0,015 M pH 8 contenant 20% de saccharose. Après lavage dans du tampon Tris 0,015 M pH8 contenant 20% de saccharose et 0,01 M de $Mg Cl_2$, les sphéroplastes sont remis en suspension soit dans un milieu de culture tryptose 0,5%, soit dans du Tris pH8, l'une ou l'autre solution contenant 20% de saccharose et 0,01 M de $Mg Cl_2$.

La suspension de sphéroplastes ainsi réalisée a une densité optique voisine de 1.

METHODES DE DOSAGE DES COLICINES

Les dosages de colicine connus lorsque nous avons commencé ce travail étaient de deux sortes :

- un dosage approximatif. Il fut mis au point par Gratia (1925).

Sur une boîte de gélose ensemencée avec une souche sensible, on dépose avec une ôse de platine des gouttes de dilutions successives d'un filtrat ou d'un surnageant de culture. On peut chiffrer en unités arbitraires la quantité de colicine par la dernière dilution ayant donné une zone de lyse claire sur la gélose. Même en standardisant au maximum les conditions du dosage : température et temps d'incubation, densité de l'ensemencement, etc... le dosage reste peu précis, et les résultats peuvent varier du simple au double.

- un dosage quantitatif : il permet de déterminer le nombre d'unités létales contenues dans une solution de colicine , une unité létale (U. L.) étant la quantité de colicine nécessaire pour tuer une bactérie (JACOB et coll, 1952). Ceci par des comptages de bactéries viables.

A 0,1 ml de solution de colicine , on ajoute 1 ml de milieu contenant $4 \cdot 10^8$ bactéries sensibles. A différents moments, des échantillons sont prélevés, dilués et étalés sur boîte de Pétri contenant du milieu de culture gélosé. Ces boîtes sont mises à incuber une nuit à 37°C. Le nombre de colonies bactériennes est alors compté. En admettant que chaque colonie provient d'une seule bactérie, on peut ainsi calculer le nombre de bactéries tuées et par conséquent, le nombre d'U. L. contenues dans la préparation de colicine dosée.

Goebel et coll(1956) ont essayé de rendre ce dosage plus simple en diminuant la concentration en bactéries. Ils choisirent une concentration ($2 \cdot 10^3$ / ml) telle que les dilutions ne soient plus nécessaires et que les étalements sur boîte de Pétri se fassent directement à partir des tubes de mélange bactéries-colicine. A ces faibles concentrations en bactéries, la probabilité de rencontre bactérie-colicine devient très faible.

Il faut alors augmenter considérablement la concentration de colicine pour obtenir un effet létal. Les unités létales ainsi dosées ne sont plus réelles, mais arbitraires. (Il faudrait , pour que le dosage corresponde à la réalité, multiplier les unités létales ainsi trouvées par un facteur de correction qui tiendrait compte de la dilution et de la nature de la colicine dosée).

Nous avons mis au point deux nouvelles techniques de dosage quantitatif des colicines.

1)- La première méthode (méthode turbidimétrique, Cavard et Barbu 1966) consiste à évaluer le nombre de bactéries survivantes d'après la densité optique des cultures faites par dilution du mélange bactéries-colicine.

2)- La deuxième méthode (Cavard et coll. 1967) consiste à évaluer le nombre de bactéries tuées par la colicine d'après la diminution de la densité optique des suspensions de ces bactéries. On mesure alors une action directe de la colicine (Chap. VI).

Ces deux méthodes ont été étalonnées par des comptages de bactéries viables. Nous allons les décrire successivement.

I- Dosage par turbidimétrie

1) Principe.

La densité optique d'une culture en phase de croissance exponentielle est proportionnelle au nombre de bactéries qu'elle contient (Monod, 1942). Elle est , pour une température , une durée d'incubation et un milieu donnés, fonction du nombre de bactéries avec lequel la culture a étéensemencée.

Ceci est vérifié par l'expérience suivante. Une culture de bactéries E. coli K12 1000 en phase de croissance exponentielle (d. o. o, 25) est diluée de 1 à 10 fois. De chaque dilution, un volume de 0,4 ml est utilisé pour ensemençer un erlen de 100 ml contenant 19,6 ml d'eau peptonée. 10 cultures ainsi réalisées sont incubées à 37° C avec agitation. Deux heures après le début de l'incubation, leurs densités optiques sont mesurées à des temps donnés.

Les densités optiques d'une culture portées sur un graphique en coordonnées semi-logarithmiques en fonction du temps sont alignées sur une droite. Les 10 cultures ayant été faites dans les mêmes conditions, les droites obtenues sont parallèles entre elles. La culture ayant atteint la plus forte densité optique est celle qui a été ensemençée avec la concentration la plus élevée en bactéries. Cette culture est la culture de référence, elle a été faite à partir de la suspension non diluée.

La figure 1 montre qu'il y a proportionnalité entre les rapports D.O. d'une culture et les dilutions

D.O. culture de référence

de la culture qui ont servi pour les ensemençements. (Les densités optiques utilisées dans ces rapports sont mesurées au même moment pour toutes les cultures. Elles sont comprises entre 0,05 et 0,5; au delà, les droites de croissance bactérienne établies d'après les densités optiques ne sont plus parallèles entre elles). Les valeurs obtenues expérimentalement sont égales ou légèrement supérieures aux valeurs théoriques. Si, parallèlement aux mesures de densité optique, les bactéries viables de chaque culture sont dénombrées par la technique des colonies sur boîtes de Pétri, on peut constater que les mesures de densité optique sont moins sujettes aux erreurs expérimentales

Aussi avons-nous adopté un dosage des colicines où la proportion de bactéries survivantes à la colicine est déterminée par des mesures de densité optique.

Si les dilutions utilisées pour faire les ensemençements dans l'expérience précédente sont remplacées par des traitements avec différentes quantités de colicine, les cultures obtenues présentent

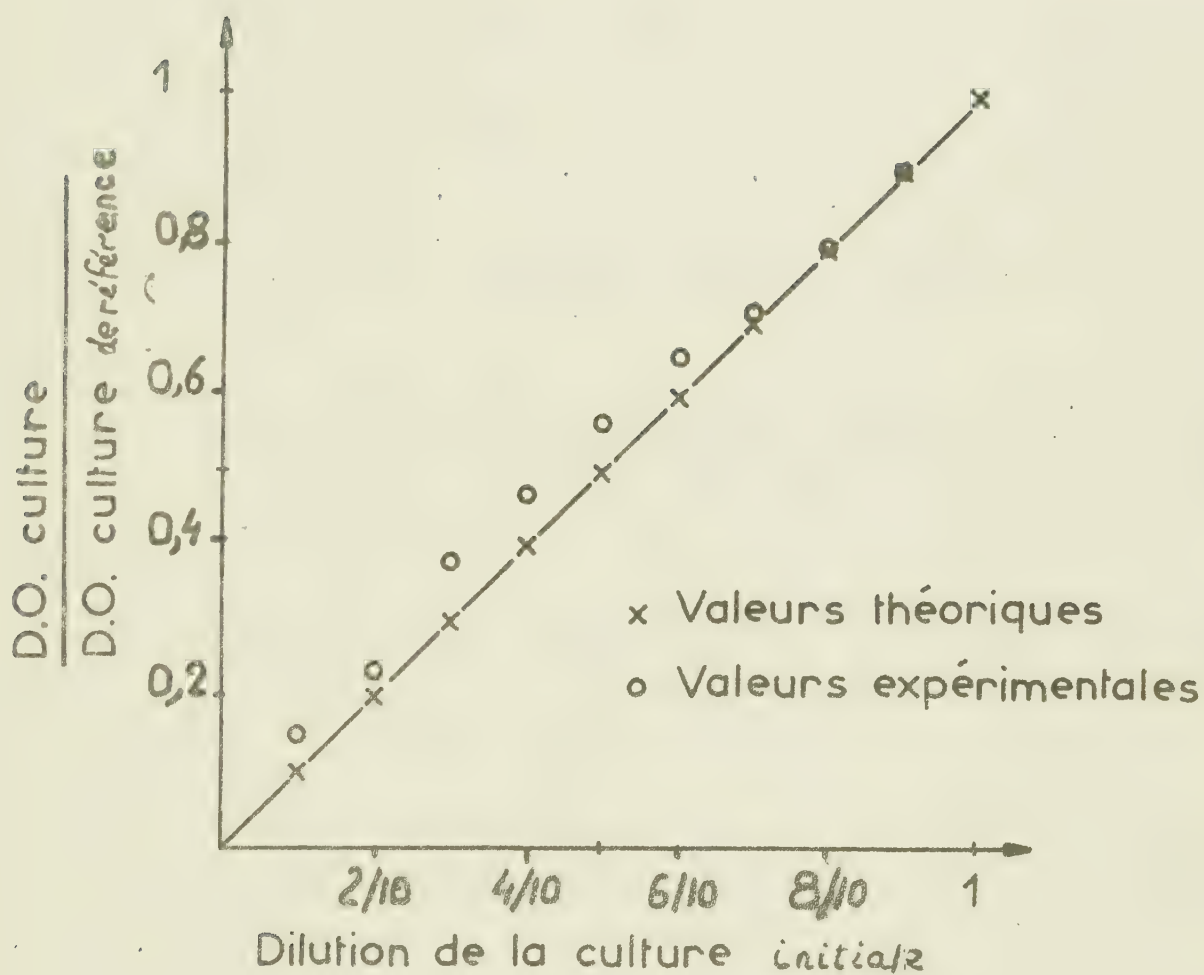


Fig.1. Densités optiques de cultures d'E.coli K12 1000 en fonction de la concentration de l'inoculum bacterien.

de la même façon un décalage dans leurs densités optiques lors de leur phase de croissance exponentielle. Ce décalage est en rapport avec le nombre de bactéries tuées par la colicine, les différentes cultures ayant étéensemencées au même moment, mais avec un nombre de bactéries viables différent selon la concentration de colicine employée. La colicine doit être utilisée à des concentrations telles que le pourcentage de bactéries survivantes soit de 50 à 100%, car c'est dans cette échelle de valeurs qu'il y a la meilleure correspondance entre les densités optiques et le nombre de bactéries de la culture au moment de l'ensemencement (fig. 1).

Ainsi, peut-on connaître le pourcentage de survie à une quantité de colicine par le rapport des densités optiques de deux cultures dont l'une a étéensemencée par des bactéries non traitées et qui sert donc de témoin et la seconde par le même nombre de bactéries traitées avec la solution de colicine à doser.

Nous allons décrire le mode opératoire du dosage, avant d'examiner tous les facteurs qui peuvent en modifier les résultats et qui nous ont amenés à choisir ce protocole de dosage.

2)- Mode opératoire

a)- On distribue en tubes de Kahn, 0,2 ml de dilutions de colicine en milieu de culture. Un tube témoin contient 0,2 ml de milieu. On ajoute à chaque tube 0,4 ml de milieu contenant $4 \cdot 10^8$ bactéries sensibles.

b)- Les mélanges bactéries-colicines et bactéries-milieu ainsi obtenus sont gardés à la température de la pièce (20° C) pendant 20 minutes, puis ils sont transvasés dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 19,4 ml de milieu. Ils sont alors incubés à 37° C avec agitation.

c)- Après deux heures d'incubation, les densités optiques de chaque culture sont mesurées. Le pourcentage de bactéries survivantes à une concentration de colicine utilisée est donnée par le rapport

$$\frac{D.O. \text{ culture col}}{D.O. \text{ culture témoin}} \times 100$$

D.O. culture témoin

Les pourcentages de survie aux différentes dilutions de colicine étant ainsi obtenues, on peut calculer le nombre d'unités létales contenues dans ces dilutions.

Ce mode opératoire a été retenu après l'étude de l'influence de chaque facteur intervenant dans le dosage.

3)- Influence de différents facteurs

Différents facteurs influencent les dosages de colicine, que ceux-ci soient réalisés en déterminant la proportion de bactéries survivantes à la colicine par des lectures de densité optique ou par comptage de colonies bactériennes. Cette influence a été étudiée et les conditions retenues sont celles pour lesquelles on obtient le maximum de bactéries tuées pour une concentration donnée de colicine.

Les facteurs qui ont trait à la fixation de la colicine sont communs à tous les dosages. Ce sont : la nature du milieu de culture, la concentration en bactéries, la concentration en colicine, le temps et la température de fixation de la colicine, la nature de la colicine et celle de la souche sensible, et enfin l'état physiologique des bactéries sensibles.

Nous étudierons en plus deux facteurs propres à notre méthode de dosage : la dilution des mélanges bactéries-colicines et la densité optique au moment de la lecture.

A)- Facteurs communs à tous les dosages

a)- Nature du milieu de culture

Les différents milieux de culture à base de bouillon nutritif : eau peptonée, Tryptose Difco à 2%, 1% ou 0,5%,... ont donné les mêmes résultats. Les milieux synthétiques sont moins intéressants car la croissance des bactéries y est beaucoup plus lente et l'incubation des bactéries à 37°C doit alors être poursuivie bien au-delà de 2 heures avant que les densités optiques ne soient mesurables.

Les dilutions de colicine étant faites dans le milieu de culture des bactéries, nous nous sommes aperçus que les dilutions

(la concentration en colicine lors du dosage est de l'ordre de 10^{-13} Molaire) dénaturent les colicines, en raison des nombreux pipettages et de l'étalement des molécules de colicine aux interfaces eau-air, eau-verre. Ce phénomène est particulièrement important avec les milieux synthétiques. Aussi, par la suite , toutes les dilutions de colicine ont été faites dans le milieu de culture additionné de 1% de sérum albumine bovine, afin de protéger la colicine contre ces dénaturations.

b)- Concentration en bactéries

En gardant constant le rapport entre le nombre de bactéries et la quantité de colicine, on peut réaliser des mélanges bactéries-colicine plus ou moins concentrés. La figure 2 présente les résultats obtenus avec des concentrations en bactéries comprises entre $2 \cdot 10^8$ et 10^6 bactéries par ml. On constate que l'on obtient la meilleure évaluation du nombre d'unités létales pour les plus fortes concentrations en bactéries. Ces conditions favorables se trouvent réalisées dans les dosages par comptage de bactéries viables mis au point par Jacob et coll. (1952), qui utilisent des concentrations en bactéries de l'ordre de $4 \cdot 10^8$ /ml, mais non dans ceux de Goebel et coll (1956) qui travaillent avec des concentrations de 1 à $2 \cdot 10^3$ bactéries/ ml.

c)- Concentration en colicine

Des concentrations différentes de colicine sont dosées à l'aide d'une culture bactérienne contenant $2 \cdot 10^8$ bactéries/ml. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3. L'obtention d'une droite dans le graphique tracé en figure 3, droite dont l'origine est à 100% de survie indique que l'action de la colicine est bien du type " coup unique ", comme l'ont démontré Jacob et coll. (1952), puis Nomura (1963). Si l'action de la colicine était du type coup multiple, la droite obtenue s'extrapolerait au-dessus de 100% de survie. Cependant, si cette action était du type " coup double " ou même " coup triple ", le palier reliant la droite obtenue à l'origine : 100% de survie, serait très petit et risquerait de passer inaperçu. Hedges (1966) a calculé toutes les courbes de survie que

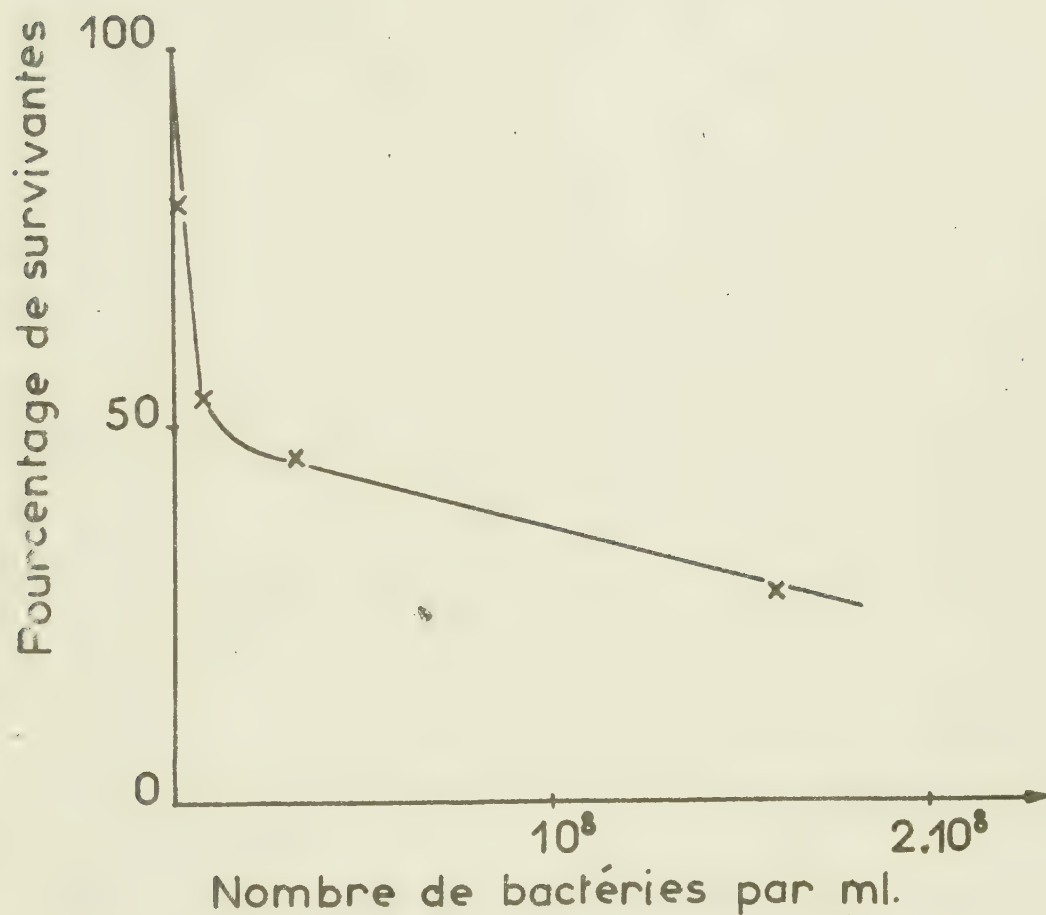


Fig.2.Effet de la concentration bactérienne sur la survie de bactéries sensibles à la colicine E₂.

Le rapport colicine/bactérie reste constant.

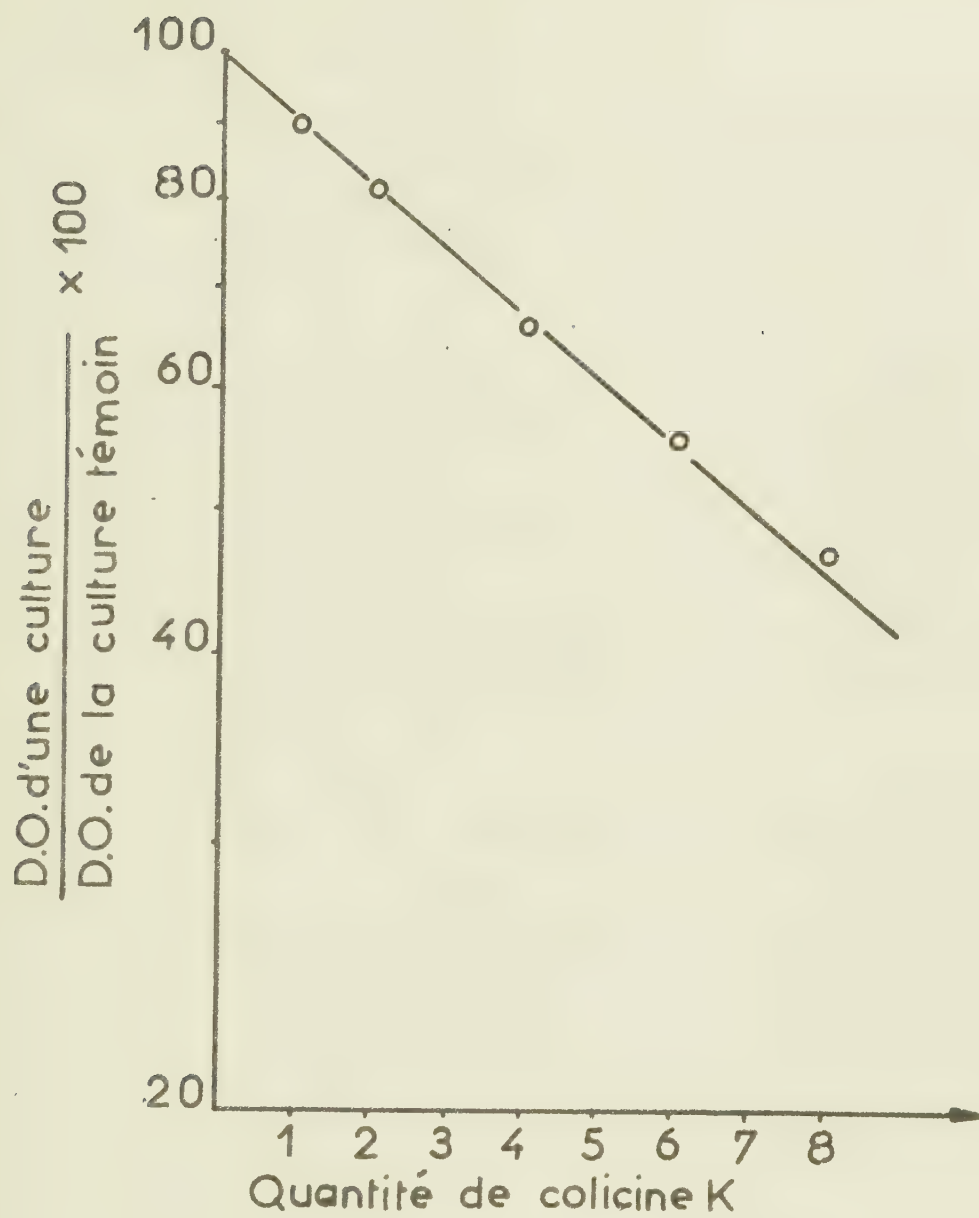


Fig.3. Effet de la concentration en colicine sur la survie des bactéries sensibles.

l'on devrait obtenir théoriquement selon les différents modes d'action envisageables. Shannon et Hedges (1967) ont vérifié que l'occupation d'un seul récepteur " létal " par la colicine E_2 suffit bien à tuer une bactérie.

Les pourcentages de survie variant exponentiellement avec la concentration en colicine, on obtient 37% de survie en traitant la population bactérienne avec 1 U.L. de colicine par bactérie. La culture utilisée pour le dosage contenant $2 \cdot 10^8$ bactéries par ml, les concentrations de colicine dosables doivent contenir de $2 \cdot 10^7$ à $2 \cdot 10^8$ U.L. par ml. Les dosages de colicine sont en cela très différents de ceux des phages où 1 particule infectieuse peut être dosée.

C'est entre 90 et 30% de survie que le dosage est le plus significatif et le plus précis : au-delà il y a un grand nombre de bactéries qui fixent plus d'1 U.L.

d)- Température et durée de fixation de la colicine

Les faibles variations de température autour de 20°C ne semblent pas influencer l'évaluation du nombre d'unités létales. En effet, lorsque les bactéries sont portées de 37° à 20°C , la croissance bactérienne se ralentit et les colicines se fixent sur des bactéries dont très peu sont en division. Au contraire, à 37°C , la croissance bactérienne est importante et la colicine est peu à peu diluée par les bactéries qui se multiplient (tableau I). Aussi une température de 20°C a-t-elle été retenue pour la fixation de la colicine.

- TABLEAU I -

Effet de la température de fixation de la colicine sur le titre de colicine obtenu par le dosage turbidimétrique.

Quantité de colicine E_2	Nombre d'unités létales		
	15°C	20°C	37°C
1 dose	$0,36 \cdot 10^8$	$0,37 \cdot 10^8$	$0,30 \cdot 10^8$
4 doses	$1,2 \cdot 10^8$	$1,23 \cdot 10^8$	$0,83 \cdot 10^8$

Le temps réservé à la fixation de la colicine est aussi un facteur critique. Il est indispensable que toute la colicine soit fixée, dans les conditions du dosage, avant de déterminer le nombre de bactéries survivantes. D'après les résultats de la figure 4, nous avons choisi un temps de fixation de 20 minutes après avoir vérifié que la densité optique de la suspension bactérienne portée de 37° à 20°C puis gardée à 20° C, ne variait pratiquement pas pendant cette période.

e)- Nature de la colicine

Nous avons titré plusieurs colicines : A, E₁, E₂, E₃, K, H, Q, V, sur la souche sensible K12 1000. Selon la colicine utilisée, l'influence d'un ou de plusieurs facteurs étudiés ci-dessus se fait particulièrement sentir. Ceci n'est pas dû à la colicine elle-même, mais au nombre respectif de récepteurs présents sur les bactéries, comme nous le montrerons plus loin (chap. II).

f)- Nature de la souche de bactéries sensibles

Nous avons dosé chaque colicine sur différentes souches sensibles d'E. coli : K12 1000, K12 3000, φ , B, et sur des souches colicinogènes. Elles peuvent avoir des degrés de sensibilité différents : la souche E. coli φ est plus sensible à la colicine K que la souche K12 3000, mais moins sensible à la colicine A que la souche E. coli B.

Sur la figure 5, sont représentés les résultats de dosages de colicine E₂, sur les souches E. coli K12 1000 et E. coli K12 (col.K.). Cette dernière souche, colicinogène pour une autre colicine que la colicine dosée, est moins sensible que la souche K12 1000. Cependant une droite est obtenue dans les deux cas, ce qui indique bien un mode d'action type coup unique de la colicine sur les deux souches. Tout se passe comme si la quantité de colicine nécessaire pour tuer une bactérie était plus importante pour la souche K12 col K que pour la souche K12 1000 : l'unité létale n'a pas la même valeur. Aussi doit-on préciser la souche avec laquelle la colicine a été dosée.

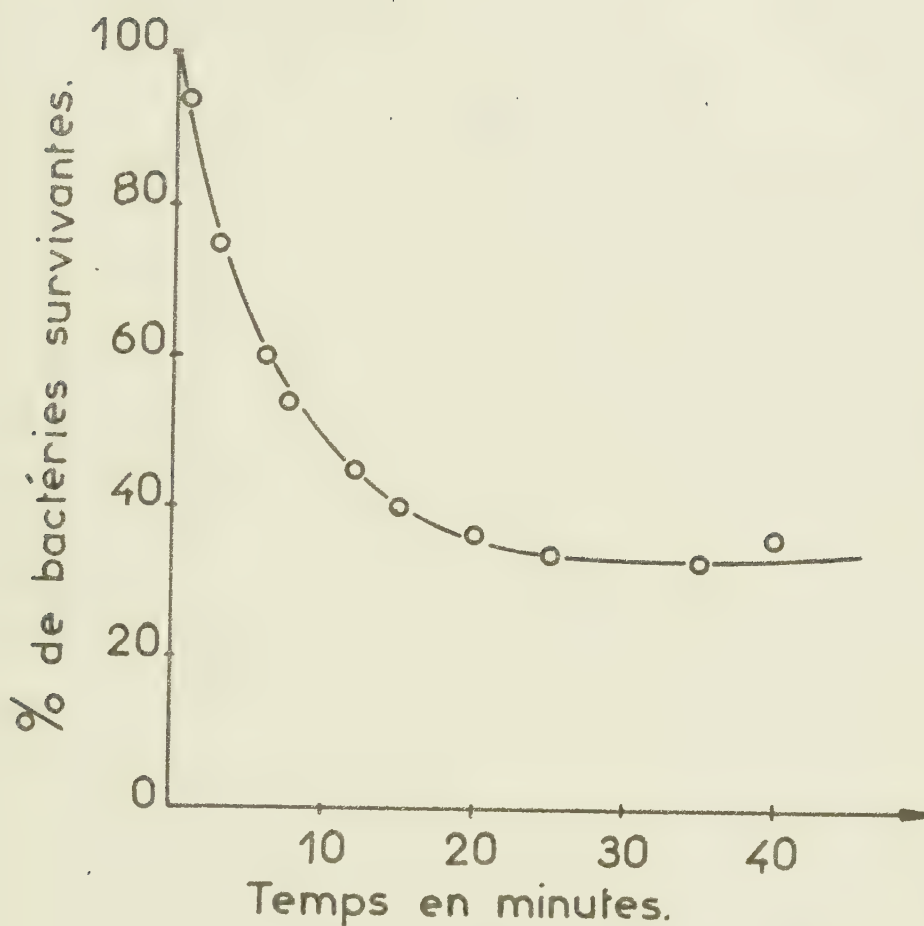


Fig.4.Effet de la durée de fixation de la colicine E₂ sur la survie des bactéries sensibles.

71 08 05 0

admission de [illegible]

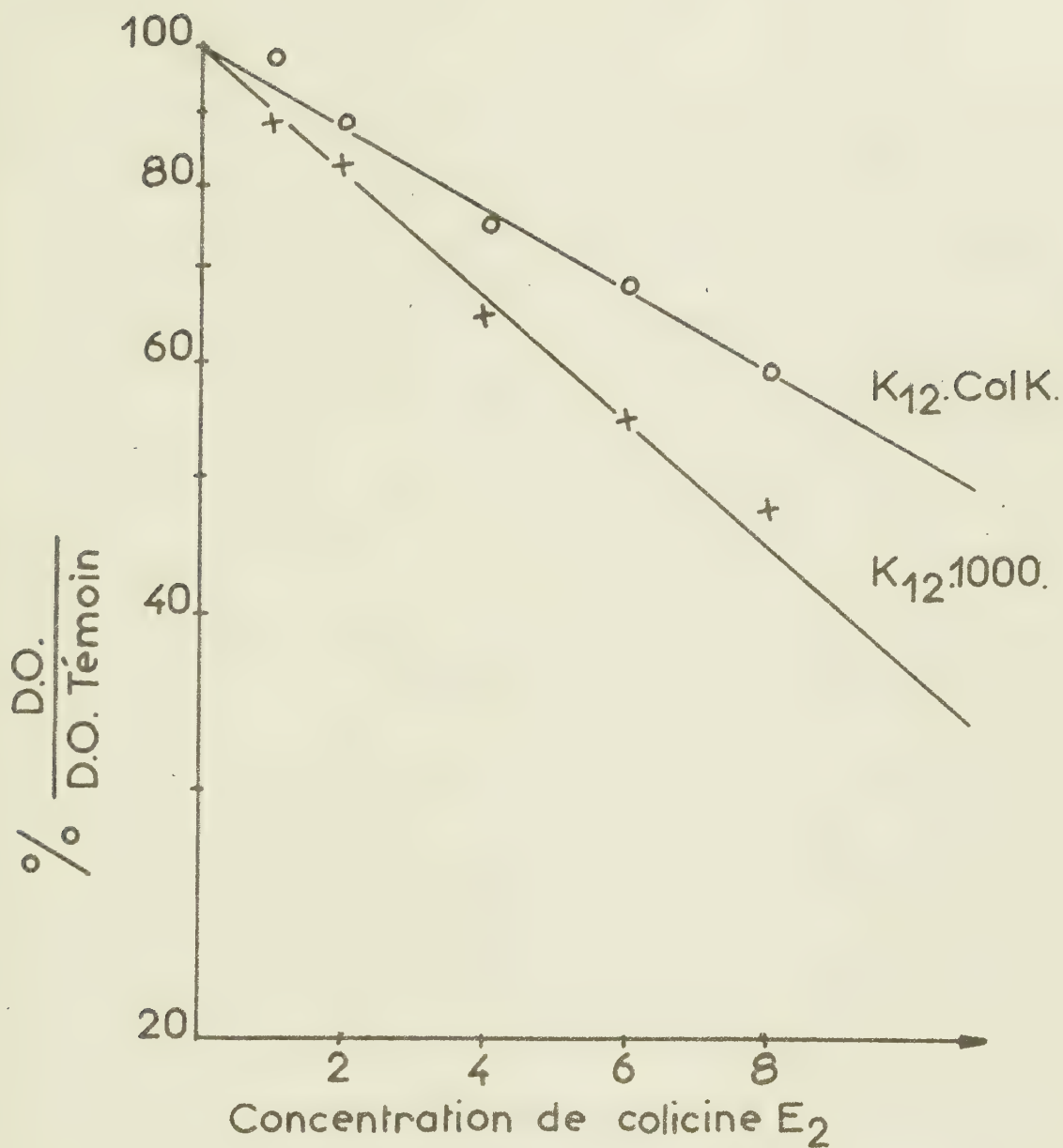


Fig.5. Influence de la souche de bactéries sensibles sur le dosage de la colicine E₂.

g)- Etat physiologique des bactéries sensibles

Les bactéries utilisées lors de ces dosages proviennent toujours d'une culture en phase de croissance exponentielle. Les bactéries provenant d'une culture en phase stationnaire ont une sensibilité moindre.

La fixation des colicines sur les bactéries sensibles est réalisée à 20°C, c'est-à-dire dans des conditions où la croissance est fortement ralentie, afin qu'elle ne vienne pas diluer la quantité de colicine à doser. L'addition au moment de la fixation, d'inhibiteurs de croissance, telle que la chloromycétine, à des doses de 20 à 50 μg par ml, augmente dans de légères proportions, la sensibilité du dosage, surtout pour les colicines dont la vitesse de fixation est lente, par exemple les colicines du groupe E.

B)- Facteurs intervenant dans le dosage turbidimétrique.

a)- Dilution des mélanges bactéries-colicine

Selon les conditions que nous avons retenues, les cultures faites par dilution du mélange bactéries-colicine ou bactéries-milieu ont une densité optique de 0,005 au temps zéro de l'incubation à 37°. Si la dilution est moins importante, densité optique de 0,020 par exemple, des erreurs interviennent lors du dosage des fortes concentrations en colicine, la densité optique des bactéries tuées étant dans ce cas non négligeable par rapport à celle des bactéries survivantes en fin d'incubation. Si, au contraire, la dilution est plus forte que celle retenue, on obtient un bon résultat, mais après un délai supérieur à 2 h.

Un volume de 20 ml a été choisi pour la dilution car il assure une bonne aération dans des erlens de 100 ml ; il n'est pas trop sensible aux variations de volume dues à l'évaporation et enfin, il permet plusieurs lectures.

b)- Densité optique au moment de la lecture

Le rapport entre les densités optiques des cultures peut être considéré comme égal à la proportion de bactéries survivantes au début de la culture si les droites obtenues en portant les densités optiques de chaque culture sur des coordonnées semi-logarithmiques en fonction du temps, sont parallèles entre elles. Dans les milieux

utilisés (Tryptose Difco 1% et eau peptonée) , ceci se produit jusqu'à une densité optique de 0,35. Nous n'avons donc pas dépassé cette densité optique pour les lectures .

A la fin de cette étude , nous constatons qu'un dosage d'unités létales de colicine doit remplir des conditions bien définies. Il doit être fait avec une concentration minimum de 10^8 bactéries : il est ainsi impossible de doser 1 U. L. de colicine ou toute quantité inférieure à 10^7 U. L. La concentration de colicine dosée doit être telle qu'elle permette la survie de 90 à 30% de la population bactérienne de départ : au-delà le dosage devient imprécis, plusieurs unités létales se fixant sur la même bactérie. Le pourcentage de survie de la colicine doit être déterminé lorsque toute la colicine a été fixée, la fixation se faisant avec une vitesse plus ou moins grande selon la colicine envisagée. La souche sensible sur laquelle a été fait le dosage doit être précisée.

Le dosage par turbidimétrie est un bon instrument pour déterminer des unités létales réelles d'une solution de colicine et pour étudier leur fixation sur les bactéries. C'est ce que nous verrons au chapitre II .

Nous avons mis au point un second dosage qui détermine directement le nombre de bactéries tuées par la colicine et non pas le nombre de bactéries survivantes à la colicine . Il devra également respecter toutes les conditions que nous venons de définir.

II- Dosage par mesure de la densité optique de la culture bactérienne traitée par la colicine.

La chute de densité optique provoquée par les colicines avait été décrite comme intervenant après quelques heures d'incubation (Hamon 1964.) Nous avons pu mettre en évidence (Cavard et coll., 1967) que cette action commence dès les premières minutes de contact et qu'il suffit d'une unité létale de colicine par bactérie pour provoquer une perte du matériel cellulaire de celle-ci. Or , nous avons vu précédemment que 1 U. L. par bactérie n'est mesurable que sur une population de 10^8 bactéries et qu'elle permet la survie de 37% de celles-ci : aussi la chute de densité optique des bactéries tuées par la colicine est masquée par la croissance des bactéries survivantes.

Un dosage mesurant l'activité de quantités de colicines inférieures à 1 U. L. par bactérie, il est indispensable d'arrêter la croissance des bactéries qui n'ont pas fixé de colicine afin de pouvoir constater la diminution de la densité optique due aux bactéries qui en ont fixé. On peut obtenir une bactériostase en diminuant la température ou en mettant les bactéries en suspension dans les milieux sans source d'énergie, mais, dans ces cas, la diminution de densité optique provoquée par les colicines est extrêmement lente. Par contre la Chloromycétine (CM) à 25 µg/ml, arrête la croissance exponentielle des bactéries sans diminuer l'action des colicines sur la densité optique de la culture. L'action de diverses quantités de colicine K en présence de chloromycétine sur la densité optique d'une culture de E. coli K12 3000 est représentée sur la figure 6. On constate que la densité optique du témoin CM augmente pour atteindre un palier entre 120 et 150 mn; celles des essais comportant de la colicine tendent également vers des paliers dont les niveaux sont fonction de la quantité de colicine utilisée.

Compte-tenu de tous les facteurs ayant une influence sur les dosages d'unités létales de colicine, nous avons choisi le mode opératoire suivant.

1)- Mode opératoire

A 4ml de culture de bactéries sensibles en milieu complet nutritif contenant $2,5 \cdot 10^8$ bactéries/ml, on ajoute à 20°C 1 ml de milieu contenant 0,15 mg de CM/ml et 1 ml de milieu contenant la colicine à titrer et 1% de sérum-albumine. On met immédiatement à incuber à 37°C avec agitation et l'on fait, après 2 heures d'incubation, une lecture de densité optique.

2)- Résultats

L'essai pour lequel la densité optique est 80% de celle du témoin contient 0,2 U. L. de colicine par bactérie. Pour obtenir une appréciation plus rigoureuse de la quantité de colicine, on fait la correction suivante : on retranche de toutes les valeurs de densité optique (y compris de celle du témoin CM) la densité optique de l'essai contenant 4 à 5 U. L. de colicine par bactérie

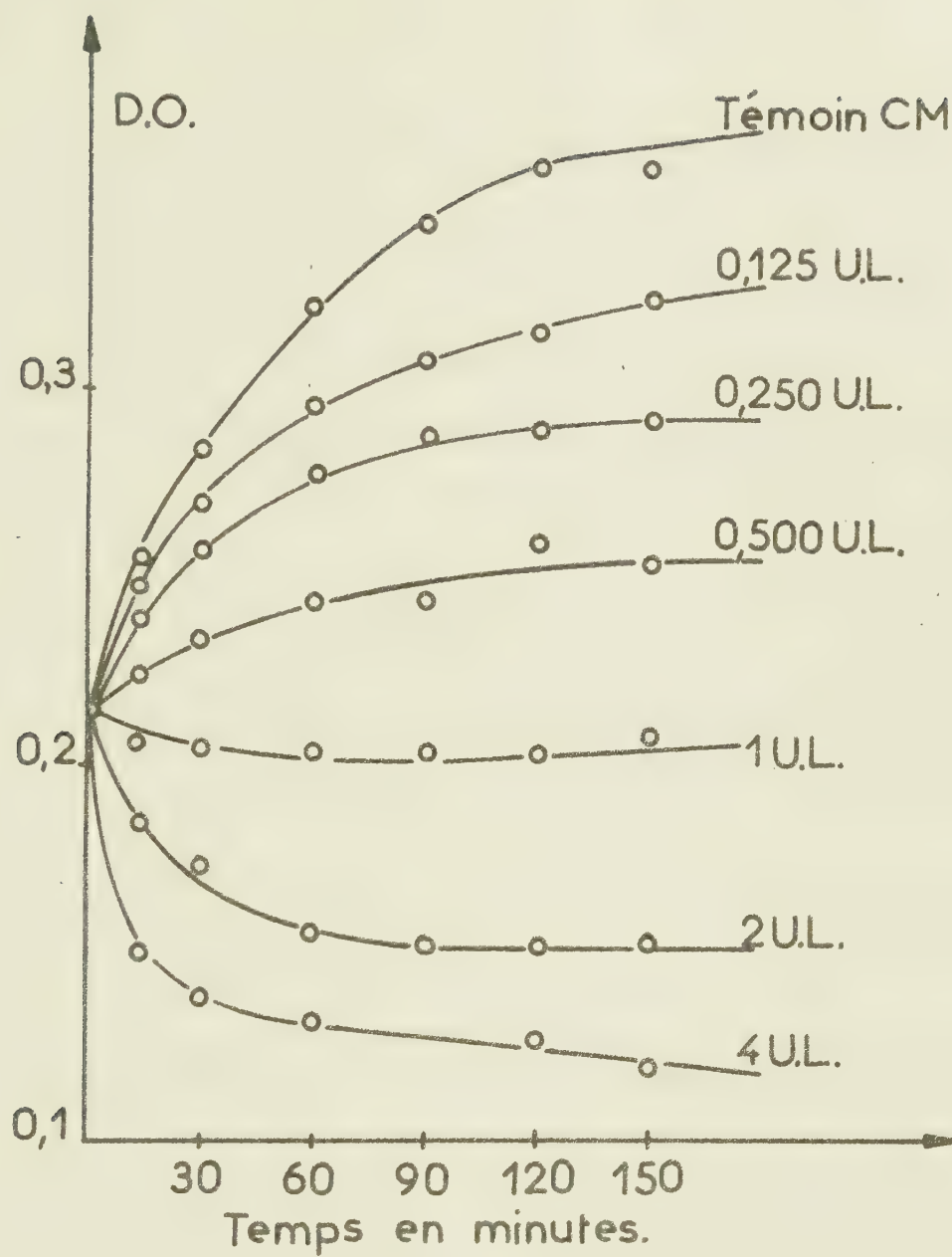


Fig.6. Influence du nombre d'U.L. de colicine K par bactérie, sur la D.O. d'une culture d'*E. coli* K₁₂ 3000 contenant 25 µg de Chloromycétine/ml.

(cette valeur représente la densité optique résiduelle des bactéries ayant subi l'action de la colicine). En faisant alors le rapport entre les valeurs des essais et celle du témoin, on obtient des résultats comparables aux pourcentages de survie déterminés par les méthodes précédemment décrites. Les pourcentages de densité optique corrigée exprimés en fonction de la dose de colicine (fig. 7) se placent, en coordonnées semi-logarithmiques , sur une droite.

3)- Etude des différents facteurs influençant le dosage.

Ce sont les mêmes que ceux décrits pour le dosage précédent. Aussi en avons-nous tenu compte lors de la mise au point du mode opératoire. Il est à remarquer que dans ce dosage , la fixation de la colicine n'est pas limitée dans le temps et se fait à 37°C, température qui augmente sa vitesse. Aussi doit-elle être complète; les unités létales ainsi déterminées représentent bien la valeur réelle de la colicine à doser . On obtient un bon titre même pour les colicines qui se fixent lentement : colicines E et A (la colicine E₂ ne provoque une diminution de la densité optique des bactéries sensibles qu'en présence de CM : voir chapitre VI).

Le dosage a été reproduit avec les souches de E. coli K12 3000, E. coli Bordet et E. coli φ Gratia. La diminution de densité optique de E. coli φ est plus lente et le seuil plus élevé, ce qui rend cette souche moins propice pour ce dosage .

4)- Influence de la nature du produit bactériostatique utilisé.

La chloromycétine a été choisie car elle donne les meilleurs résultats, mais on peut la remplacer par une quantité cinq fois plus grande de streptomycine. La lecture de densité optique se fait alors 45 mn après le début de l'incubation , car , par la suite , la densité optique du témoin streptomycine diminue comme celle des essais.

La puromycine peut également être utilisée comme bactériostatique , mais elle permet une trop importante augmentation de densité optique du témoin.

Le formol à concentration finale 1/20 000 arrête l'augmentation de densité optique des bactéries témoins sans arrêter la diminution provoquée par les colicines préalablement fixées sur les bactéries à 20°C; . Son utilisation présente un inconvénient : la

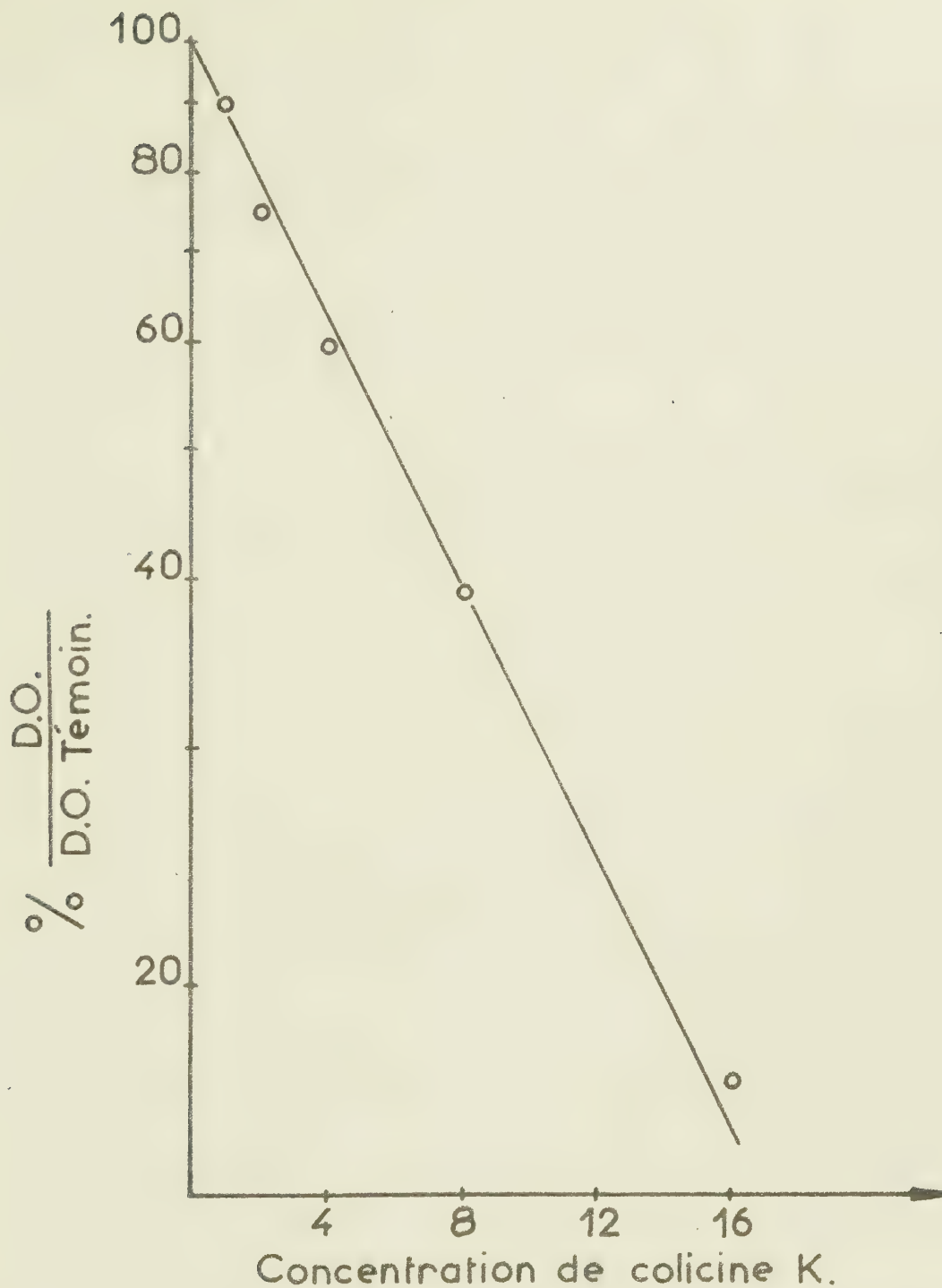


Fig.7. Dosage de la colicine K par mesure de la diminution de D.O. des suspensions de bactéries sensibles.

fixation des colicines doit alors se faire avant l'addition du formol. ceci nous rapproche des conditions du titrage habituel dans lequel on ménage un temps de fixation de la colicine avant de faire les dilutions nécessaires au comptage des bactéries survivantes.

La diminution de la densité optique des bactéries traitées par la colicine est inhibée en présence de versène (EDTA) $2 \cdot 10^{-2}$ M ou de dinitrophénol $2 \cdot 10^{-3}$ M.

Ce dosage présente une rapidité et une facilité d'exécution très particulières et fut par la suite utilisé en routine pour connaître l'activité des préparations de colicine.

°
° °

Deux dosages des unités létales de colicine sont décrits. Ils comportent tous les deux des mesures de densité optique et permettent de déterminer la quantité d'unités létales contenues dans une préparation de colicine en 2 h. environ. Ils comportent, comme tous les dosages de colicine, deux parties : la fixation des colicines sur les bactéries sensibles et l'évaluation des bactéries tuées par cette colicine. Dans le premier dosage, ces deux étapes sont bien séparées car le dosage des U.L. se fait par l'évaluation des bactéries survivantes à la colicine, la division cellulaire étant utilisée pour contrôler la survie. Dans le deuxième dosage, la fixation n'est pas limitée dans le temps, car c'est la proportion de bactéries tuées par la colicine qui est évaluée, la diminution de la densité optique des bactéries traitées par la colicine permettant d'évaluer cette proportion.

La fixation des colicines est la partie la plus délicate de tout dosage, car de nombreux facteurs l'influencent. Elle doit être totale pour que le titre obtenu corresponde bien à toutes les unités létales de colicine présentes. Les dosages que nous avons mis au point, et plus particulièrement le premier dosage décrit, nous ont permis d'étudier en détail la fixation de plusieurs colicines.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA FIXATION DES COLICINES K, E et A.

Les colicines se fixent, comme les phages, sur des récepteurs spécifiques situés à la surface des bactéries sensibles (BORDET et BEUMER 1948 - FREDERICQ, 1952 - MAYR. HARTING, 1964). FREDERICQ (1946, 1948) a mis en évidence la diversité des récepteurs des colicines en montrant que les bactéries peuvent perdre l'un ou l'autre de ces récepteurs par des mutations indépendantes; les bactéries qui ont perdu la propriété d'édifier un récepteur donné deviennent résistantes à la colicine qui se fixait sur celui-ci, mais restent sensibles à toutes les autres colicines. La constitution chimique des différents récepteurs n'est pas connue, ceux-ci ne sont définis que par des critères génétiques. Une vingtaine de récepteurs différents ont ainsi été identifiés et désignés par des lettres de A à V. Les colicines sont désignées par la même lettre que le récepteur bactérien sur lequel elles se fixent.

Des colicines différentes peuvent se fixer sur un même récepteur; elles sont alors distinguées entre elles par leurs propriétés et leur mode d'action: c'est le cas des colicines E1, E2 ou E3 (NOMURA, 1963) ou des colicines F1, F2, F3, F4 (HAMON, 1966). Par contre, des colicines qui se fixent sur des récepteurs différents peuvent avoir des modes d'action semblables: c'est le cas des colicines K et E1 (NOMURA et MAEDA, 1965). On peut ainsi distinguer pour chaque colicine une spécificité de fixation et une spécificité d'action, spécificités indépendantes l'une de l'autre (MAROTEL - SCHIRMANN et BARBU, 1969).

MAYR-HARTING et SHIMELD (1965) puis MAEDA et NOMURA (1966) ont montré que la quantité de colicine E2 qui peut se fixer sur une bactérie est limitée: 11 à 30 unités létales (U.L.) par bactérie.

Les récepteurs bactériens peuvent donc être saturés en colicine. En est-il ainsi pour les autres colicines et quel est le nombre d'U. L. qu'une bactérie peut fixer au maximum dans chaque cas? C'est ce que nous avons cherché à savoir, en étudiant plus particulièrement les colicines A, E1, E2, et K. Le comportement de la colicine E1 a été étudié comparativement à celui de la colicine E2, déjà connu.

Nous avons également cherché à savoir s'il existait une relation entre la vitesse de fixation d'une colicine sur une bactérie et le nombre maximum d'U. L. que celle-ci peut fixer.

Mais auparavant, nous avons étudié la réversibilité de la fixation des colicines. Dans les conditions du dosage, la colicine fixée ne peut se détacher et conserver son activité car les courbes de survie des dosages ne seraient pas celles obtenues. Le mode d'action des colicines ne serait pas de type coup-unique, mais de type enzymatique. Par contre si la colicine se détache et perd son activité après avoir tué une bactérie, il est très difficile de le mettre en évidence. Nous avons essayé de récupérer de la colicine active en traitant par différents agents des bactéries qui en avaient fixée.

I - ETUDE DE LA REVERSIBILITE DE LA FIXATION DES COLICINES.

La nature de la liaison entre une colicine et son récepteur n'est pas connue. Elle pourrait être semblable à la liaison phages-récepteurs ou à la liaison antigène-anticorps.

Pour obtenir des données à ce sujet, nous avons effectué les expériences suivantes :

a)- Les bactéries E. coli K12 1000 ou E. coli φ sont mises en présence d'une forte multiplicité de colicine : 1000 U. L. par bactérie de colicine A, E1, E2, ou K. Après 20 mn de contact à 20° ou à 37°C, les bactéries sont centrifuguées, lavées à froid et remises en suspension dans différents milieux : tryptose 1%, EDTA 10^{-3} M, Tris 10^{-2} M pH 7, 8, NaCl 1 M, saccharose 20%, cystéine 10^{-2} M, eau saturée en chloroforme contenant ou non de l'EDTA 10^{-3} M. Après incubation

à 20° ou à 37° C, pendant 5 à 60 mn, les bactéries sont centrifugées et un dosage de colicine est effectué sur le surnageant de centrifugation.

Aucune U.L. de colicine n'a été retrouvée dans ces surnageants; la colicine fixée sur les récepteurs ne se détache pas dans ces conditions .

b)- Les récepteurs des bactéries sont saturés en colicine K comme précédemment décrit, puis les bactéries sont transformées en sphéroplastés à l'aide de l'EDTA 10^{-2} M et de lysozyme 200 µg/ml.

La colicine fixée sur les récepteurs ne se détache ni lors de la formation des sphéroplastés ni après l'éclatement de ceux-ci par choc osmotique.

c)- A une suspension de E. coli K12 1000 contenant $2,5 \cdot 10^8$ bactéries par ml, on ajoute de 5 à 80 U.L. de colicine par bactérie dans les conditions du dosage. Après 20 mn de contact à 20°C, une partie de cette suspension est centrifugée. Un dosage de colicine est effectué d'une part sur le surnageant de centrifugation et d'autre part sur la suspension non centrifugée. (Les bactéries contenues dans cette suspension sont tuées par la colicine et ne viennent pas fausser le dosage).

On constate (Tableau II) que presque toute la colicine K ajoutée s'est fixée sur les bactéries , car il ne reste plus dans le surnageant de centrifugation de la suspension que 1 à 5% de la colicine K ajoutée. En outre , la suspension et le surnageant de centrifugation de cette suspension contiennent le même nombre d'unités létales de colicine K. La colicine K fixée sur les bactéries qu'elle a tuées ne peut s'en détacher pour agir de nouveau sur les bactéries servant au dosage.

Avec les colicines E1, E2, ou A, la fixation est incomplète (Tableau III), mais le nombre d'U.L. de colicine non fixées trouvé dans le mélange bactéries-colicine est le même que celui trouvé dans le surnageant de centrifugation de ce mélange.

Aussi, pour doser la quantité de colicine non fixée, on peut

TABLEAU II

Fixation de la colicine K sur E. coli K12 1000 en fonction de la quantité de colicine K.

U. L. de colicine K ajoutées à 10^8 bactéries.	U. L. de colicine K trouvées libres	
	dans le mélange bactéries-colicine	dans le surnageant de centrifugation du mélange
5 10^8	0,05 10^8	0,02 10^8
10 "	0,12 "	0,12 "
20 "	0,07 "	0,11 "
40 "	2,75 "	3 "
80 "	4,5 "	4,5 "

TABLEAU III

Fixation de la colicine E2, sur E. coli K12 1000 en fonction de la quantité de colicine E2.

U. L. de colicine E2 ajoutées à 10^8 bactéries	U. L. de colicine E2. trouvées libres	
	dans le mélange bactéries-colicine	dans le surnageant de centrifugation du mélange.
15 10^8	9 10^8	12 10^8
60 "	48 "	43 "

invariablement utiliser le surnageant de centrifugation du mélange bactéries-colicine ou le mélange lui-même. Dans la suite de nos expériences, les dosages seront faits directement sur le mélange bactéries-colicine, les centrifugations ou les filtrations étant superflues.

La fixation des colicines paraît irréversible; toutefois une quantité de colicine inférieure à celle que nous pouvons doser pourrait se détacher.

II)- ETUDE DE LA SATURATION DES RECEPTEURS EN COLICINE.-

Le nombre de récepteurs de chaque colicine présents ou tout au moins accessibles à la surface d'une bactérie peut être évalué d'après le nombre maximum de molécules de cette colicine que la bactérie peut fixer. Expérimentalement, la quantité de colicine fixée est estimée par la différence entre la quantité de colicine ajoutée aux bactéries et celle trouvée en solution après le temps accordé à la fixation.

1)- Mode opératoire

A 0,4 ml d'une suspension contenant 10^8 bactéries, on ajoute 0,2 ml de solution de colicine contenant de 10^9 à 10^{11} U.L. Le mélange bactéries-colicine est laissé 20 mn à 20° C ou à 37° C, puis la quantité de colicine qui ne s'est pas fixée est dosée (Le nombre d'U.L. ajoutées est tel qu'il ne peut y avoir de bactéries survivantes, aussi une température de 37° C n'a d'autre conséquence que d'accélérer la fixation).

La fixation des colicines sur des souches de bactéries colicinogènes a pu être étudiée après traitement de ces bactéries par le formol afin de les empêcher de produire de la colicine. Les bactéries sont laissées 5 mn en présence de formol (concentration finale 10%), puis elles sont lavées et mises en suspension dans le milieu de culture (tryptose 1%) de façon à obtenir une densité optique égale à celle des bactéries non traitées.

2)- Résultats obtenus avec la colicine K

Les résultats obtenus avec plusieurs souches bactériennes sont présentés dans le Tableau IV. Les souches de bactéries sensibles E. coli ⁴, Bordet et K12 peuvent fixer 600 U.L. de colicine K. Les souches colicinogènes K12 (Col K), K12 137 (Col E2) en fixent le même nombre. Les résultats obtenus avec les souches colicinogènes formolées sont significatifs, car les bactéries K12 3000 formolées fixent le même nombre d'U.L. que les K12 3000 non formolées. Le formol n'altère donc pas les récepteurs sur lesquels se fixe la colicine K.

Les récepteurs des bactéries productrices de colicine K n'ont pas été saturés lors de la croissance de ces bactéries, bien qu'une quantité non négligeable de colicine ait été produite pendant la culture (JACOB et coll., 1952). La fixation de la colicine sur les bactéries productrices pourrait être réversible, cette réversion serait alors très difficile à mettre en évidence et ne se produirait plus sur les bactéries formolées.

Par notre méthode, nous ne pouvons distinguer la colicine fixée de la colicine inactivée. Mais le fait que certaines souches telles que E. coli ML 30 ne fixent pas de colicine, confirme qu'il s'agit bien d'une fixation. De plus , la quantité maximale de colicine fixée n'augmente ni en fonction de la concentration en colicine, ni en fonction de la température , ni en fonction du temps de fixation entre 20 et 180 mn. Une inactivation n'aurait aucune raison d'être ainsi limitée.

3) Résultats obtenus avec les colicines E1 et E2.

Les résultats obtenus avec la colicine E2 (Tableau III) montrent que le nombre d'U.L. de colicine E2 fixées par bactérie est bien inférieur à celui obtenu avec la colicine K. On constate également que les bactéries n'ont pas fixé, en 20mn., toute la quantité de colicine qu'elles peuvent fixer. Une fraction importante de colicine est retrouvée en solution alors qu'il reste encore des récepteurs non occupés; les récepteurs des colicines E sont saturés plus lentement que ceux de la colicine K.

TABLEAU IV

U. L. de colicine K fixées par bactérie de différentes souches formolées ou non formolées. (La colicine K est dosée sur E. coli φ).

Souche bactérienne	Nombre d'unités létales par bactérie		
	U. L. ajoutées	U. L. non fixées	U. L. fixées
E. coli φ	585	80	505
	710	150	560
E. coli Bordet	585	43	542
	733	111	621
E. coli K12 1000	183	6	177
	570	163	407
E. coli K12 3000	710	89	621
E. coli K12 3000 formolées	585	147	438
	733	165	568
E. coli K12 (Col K) formolées	270	24	246
E. coli K12 (Col E2) formolées	270	17	250
	733	161	571
	1160	518	642
E. coli M L 30 (Col E1) formolées	270	270	-
C. freundii C A 21 (Col A) formolées	270	270	-

TABLEAU V

Influence de la concentration bactérienne sur le dosage de la colicine E1.

Quantité de colicine E1	Nombre de bactéries E.coli K12 3000 par ml	Titre obtenu (U.L.)
1 dose	2,5 10^8	0,34 10^8
	10 "	0,52 "
	20 "	0,48 "
2 doses	2,5 "	0,75 "
	10 "	1,18 "
	20 "	1,12 "

Aussi l'influence de la concentration bactérienne sur la fixation des colicines E et sur leur dosage a été de nouveau étudiée. Les résultats portés dans le tableau V montrent que le titre de colicine E1 est plus élevé lorsqu'il est obtenu avec une concentration en bactéries de 10^9 /ml que lorsqu'il est obtenu dans les conditions du dosage standard. Avec des concentrations en bactéries supérieures à 10^9 /ml, il ne varie plus. Il en est de même pour la colicine E2.

Le titre obtenu dans les conditions du dosage standard est donc inférieur au titre réel: l'unité létale ainsi mesurée ne représente pas la plus petite quantité de colicine nécessaire pour tuer une bactérie; c'est donc, en quelque sorte, une unité arbitraire. Les U.L. réelles de colicine E1 ou E2 ne peuvent être dosées qu'avec une concentration bactérienne correspondant à une densité optique de 1.

Aussi la fixation des colicines E a-t-elle pu être étudiée dans ces nouvelles conditions, les U.L. étant fixées, puis dosées, sur des suspensions bactériennes de d.o. 1. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI: une bactérie sensible E.coli φ ou E.coli K12 3000 fixe au maximum 60 U.L. de colicine E1. Les bactéries colicinogènes formolées fixent également de la colicine E1 ou E2, mais le nombre d'U.L. fixées par bactérie est, dans ce cas, légèrement inférieur à celui obtenu avec les souches sensibles.

TABLEAU VI

U.L. de colicine E1 fixées par bactérie de différentes souches formolées ou non formolées. (La colicine E1 est dosée sur E. coli ψ)

Souche bactérienne	Nombre d'unités létales par bactérie		
	U.L ajoutées	U.L. non fixées	U.L. fixées
E. coli ψ	22	8	14
	47	23	24
	90	42	48
	312	253	59
E.coli K12 3000 formolées	47	37	10
	90	49	41
E. coli K12(col E2)formolées	47	37	10
	90	72	17
E. coli ML 30(col E1)formolées	47	45	2
	90	65	25
C. freundii CA 21 (col A)formolées	47	35	12
	90	69	21

4) Résultats obtenus avec la colicine A.

En opérant comme décrit dans le mode opératoire sur *E. coli* ϕ et non sur *E. coli* K12, en ajoutant de 0,7 à 1000 U.L. de colicine A par bactérie, on ne constate aucune fixation : la colicine A est retrouvée dans le surnageant de centrifugation du mélange bactéries-colicines, bien qu'elle ait exercé son action létale sur les bactéries.

Afin de vérifier si la colicine A se fixe sur les bactéries, on utilise un autre mode opératoire. Un culot de centrifugation contenant 10^8 bactéries est mis en suspension dans une quantité de colicine A produisant, en 20 mn, une mortalité de 60% de ces bactéries. Après 20 mn de contact à 20° C, la suspension est centrifugée et le surnageant de centrifugation est transvasé sur un culot de centrifugation contenant de nouveau 10^8 bactéries sensibles. On met en suspension, puis on laisse en contact 20 mn. On répète l'opération 4 fois de suite, en ayant soin de faire cette expérience sur deux séries de tubes pour pouvoir déterminer chaque fois le nombre de bactéries survivantes. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau VII : tous les surnageants de centrifugation tuent le même nombre de bactéries ; ils semblent contenir la même quantité de colicine A. Tout se passe comme si la colicine A se détachait des bactéries après les avoir tuées et pouvait alors en tuer de nouvelles. Ceci est contraire au mode d'action de cette colicine qui agit, comme les autres colicines, selon une cinétique de coup unique.

TABLEAU VII

Activité de la colicine A en fonction de la durée de la fixation et du nombre de bactéries.

N° essai	Mélange E. coli φ . Colicine A	Durée de la fixation en mn à 20°C.	Pourcent- tage de survie
1	Col A + 10^8 bactéries	20	60
2		40	42
3		60	20,5
4	Surnageant de $1 + 10^8$ bactéries	20	51
5	" de $4 +$ "	20	64
6	" $5 +$ "	20	66
7	Surnageant de $2 + 10^8$ bactéries	20	59
8	" $7 +$ "	20	61,5
9	Surnageant de $3 + 10^8$ bactéries	20	64
10	" de $3 + 10^8$ "	20	64

TABLEAU VIII

Influence de la concentration bactérienne (*E.coli* φ .)
sur l'activité de la colicine A.

Quantité de colicine A (0,2 ml)	Nombre de bactéries utilisées dans 0,4ml.	Nombre de bactéries tuées en 30 mn à 20°C
1 dose	0,4 10^8	0,11 10^8
	1 "	0,21 "
	2 "	0,46 "
	4 "	0,84 "
5 doses	1 "	0,66 "
	7,4 "	7,07 "
	24 "	10 "
	74 "	29,3 "

Les résultats précédents (tableau VII) montrent que la fixation de la colicine A est incomplète en 20 mn et même en 40 mn. Afin d'obtenir une fixation totale, nous avons augmenté la concentration en bactéries (Tableau VIII) Nous constatons que la même quantité de colicine peut tuer 50 fois plus de bactéries lorsque le nombre de celles-ci passe de 10^8 à $7,4 \cdot 10^9$. Ainsi dans les conditions habituelles des dosages quantitatifs ($2,5 \cdot 10^8$ bactéries par ml et 20 mn de fixation à 20° C), la fixation de la colicine A

est incomplète ; le titre obtenu est au moins 50 fois plus faible que le titre réel. Ces résultats peuvent être interprétés en admettant que les bactéries E. coli φ ne peuvent fixer qu'une à 5 U.L. de colicine A.

Afin de nous assurer que le comportement de la souche E. coli φ ne constituait pas un cas particulier, nous avons fait agir la colicine A sur d'autres souches. Les titres de colicine A obtenus à l'aide de la souche E. coli B sont supérieurs à ceux obtenus avec E. coli φ : Tableau IX.

TABLEAU IX

Influence de la souche bactérienne sur le dosage de la Colicine A.

Quantité de colicine A	Nombre de bactéries utilisées	Titre de la dose de colicine A	
		Sur E. coli φ	sur E. coli B
1 dose	0,4 10^8	0,12 10^8 U.L.	0,12 10^8 U.L.
	1 "	0,23 "	0,49 "
	2 "	0,52 "	1,10 "
	4 "	1,04 "	2,5 "

Ce fait suggère que les bactéries E. coli B possèdent davantage de récepteurs pour la colicine A que les bactéries E. coli φ .

En somme, une bactérie peut fixer beaucoup d'U.L. de certaines colicines, comme la colicine K, mais très peu d'U.L. d'autres colicines comme la colicine A.

D'après l'activité de préparations purifiées de colicine, Dandeu (1969) a pu calculer qu'à une U.L. correspondent en moyenne 50 molécules de colicine K, 100 molécules de colicine E et 200 molécules de colicine A. En nous basant sur les données de cet auteur et en admettant qu'à chaque molécule de colicine fixée correspond un récepteur, on peut calculer, compte tenu du nombre maximum d'U.L. que peut fixer une bactérie, qu'une bactérie sensible d'E. coli possède environ 30 000 récepteurs pour la colicine K, 6 000 pour les colicines du groupe E et moins de 200 pour la colicine A.

III - ETUDE DE LA VITESSE DE FIXATION DES COLICINES .

Les vitesses initiales de fixation sont proportionnelles à la quantité de colicine (JACOB, 1952; HEDGES, 1966). Ce fait confirme que les colicines agissent selon une cinétique de " coup unique ".

Nous étudions ici la vitesse de fixation des colicines dans un but pratique, celui de trouver le temps nécessaire à la fixation de toute la colicine ajoutée aux bactéries, condition indispensable pour des dosages quantitatifs.

Selon les conditions des dosages décrits, on ajoute à $2,5 \cdot 10^8$ bactéries une quantité de colicine contenant environ une U.L. par bactérie et on laisse incuber à 20° ou à 37°C . Des échantillons sont prélevés toutes les 3 à 5 mn et le pourcentage de survie des bactéries est déterminé. Nous constatons que seule la fixation de la colicine K (fig.8) est totale en 5 mn à 20°C ; la fixation des colicines E2 (fig.9) et E1 (fig.10) nécessite environ 60 minutes et celle de la colicine A continue même après ce délai (fig.11).

En outre, la quantité de colicine fixée en 2mn sur 10^8 bactéries à 20°C est très différente d'une colicine à l'autre : 10^8 bactéries E. coli ϕ fixent. en 2mn à 20°C , $7 \cdot 10^7$ U.L. sur 10^8 U.L. de colicine K, 10^7 U.L. sur 10^8 U.L. de colicine E et seulement 10^7 U.L. sur 10^{10} U.L. de colicine A.

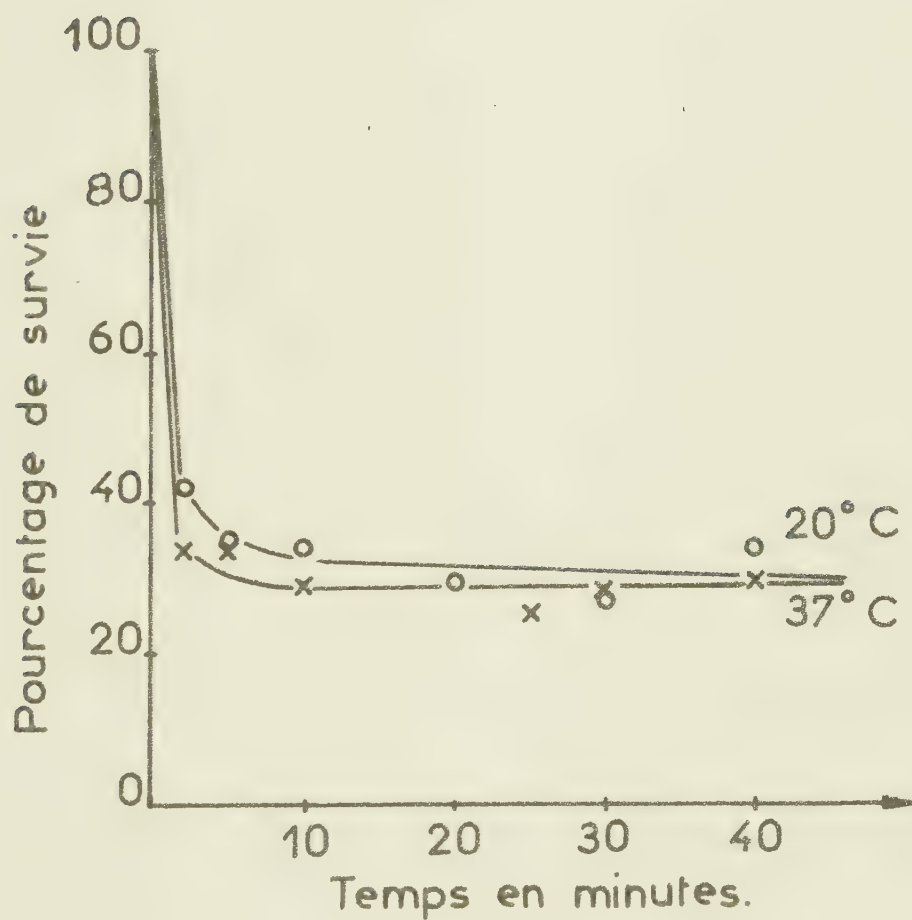


Fig.8. Fixation de la colicine K sur *E. coli* K₁₂, en fonction du temps et de la température.

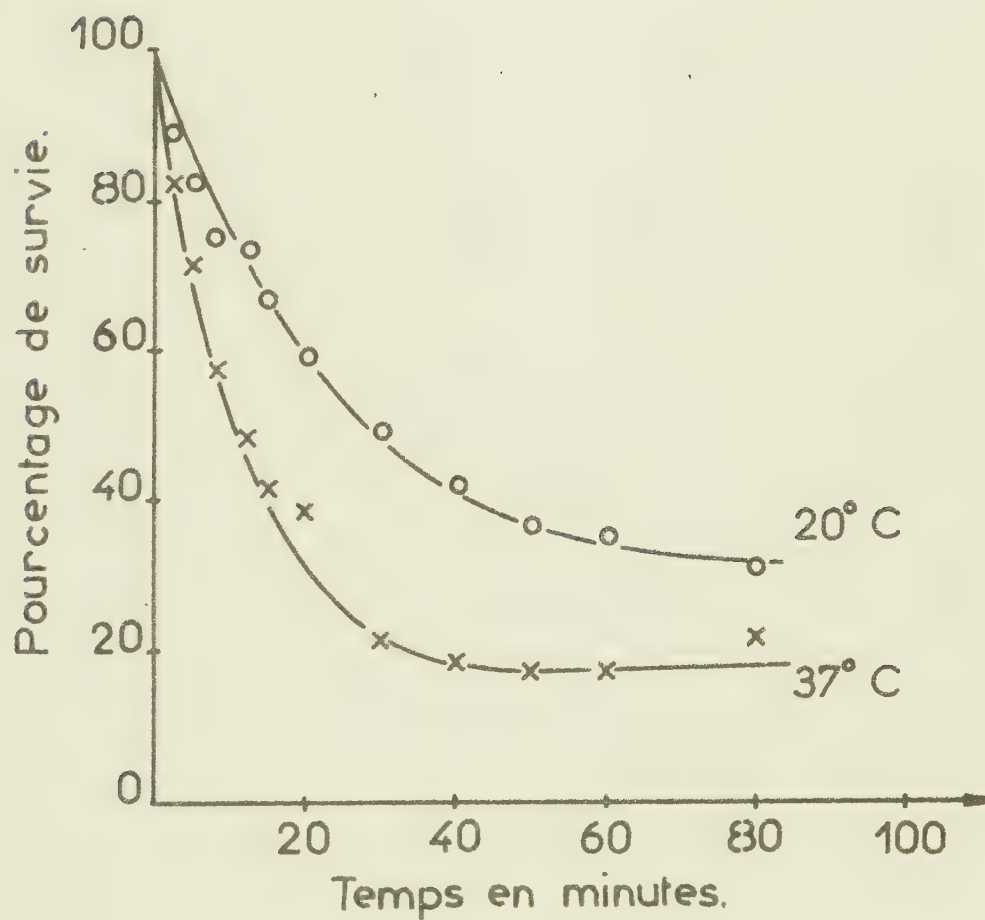


Fig.9. Fixation de la colicine E₂ sur *E. coli* K₁₂ en fonction du temps et de la température.

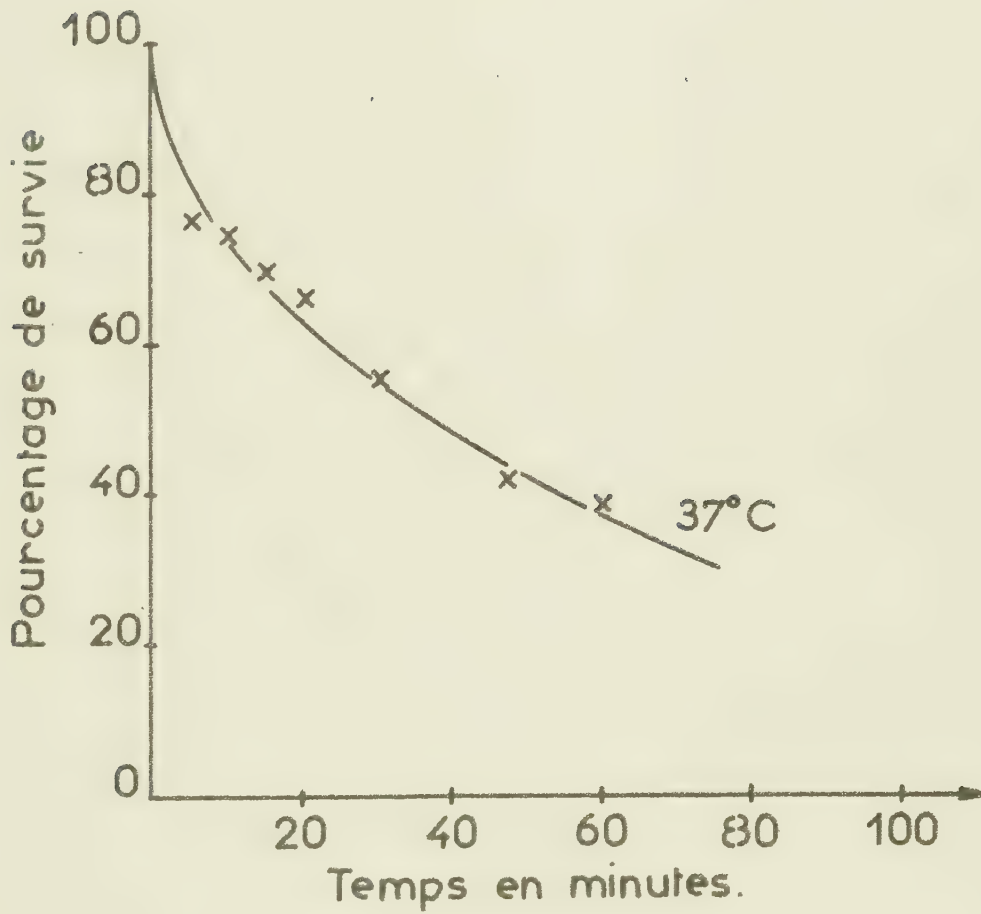


Fig.10. Fixation de la colicine E₁ sur E.coli K₁₂ en fonction du temps.

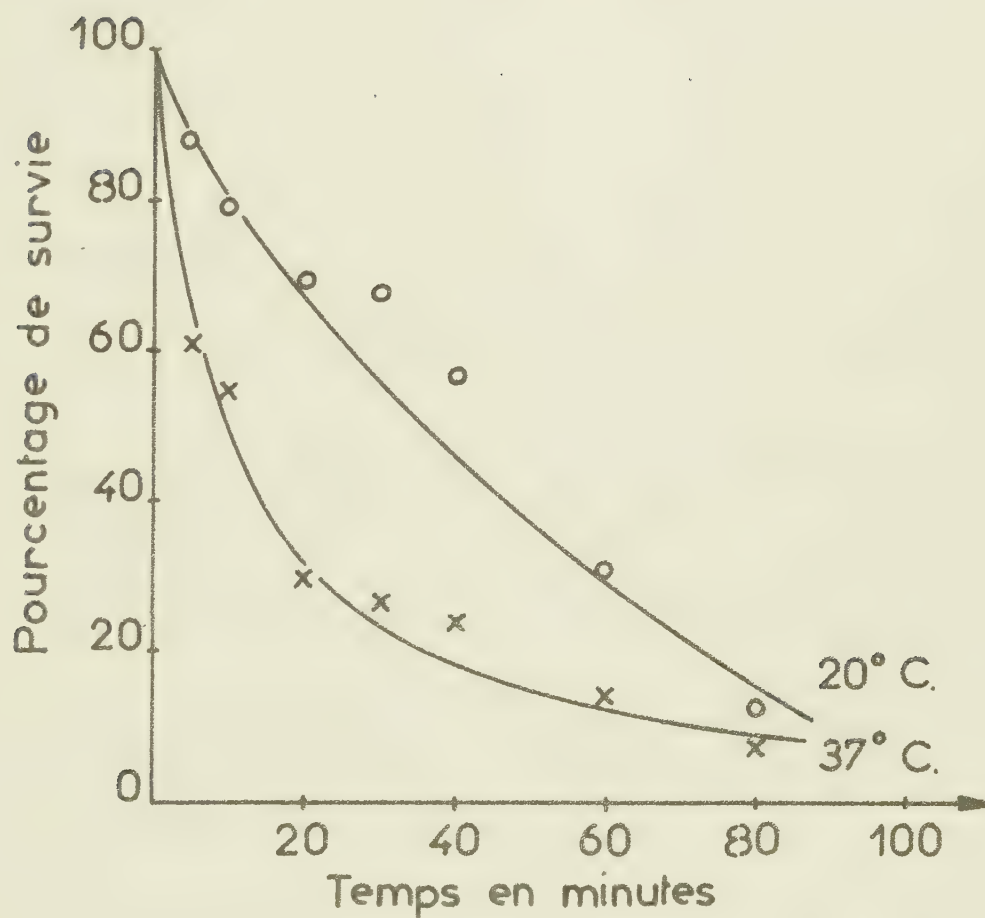


Fig.11. Fixation de la colicine A sur *E. coli* en fonction du temps et de la température.

Il y a donc un rapport entre la vitesse de fixation d'une colicine et le nombre de récepteurs correspondants sur la bactérie. Les colicines trouvant de nombreux récepteurs à la surface de la bactérie, comme la colicine K, se fixent beaucoup plus rapidement que celles qui disposent d'un nombre réduit de récepteurs, comme la colicine A.

° °

CONCLUSIONS.

- La fixation des colicines est spécifique, limitée et pratiquement irréversible.

- Les récepteurs des colicines sont différents entre eux non seulement au point de vue qualitatif mais également au point de vue quantitatif. Une bactérie E.coli φ pouvant fixer 600 U.L. de colicine K, 60 U.L. de colicine E1 ou E2 et 1 à 5 U.L. de colicine A, peut posséder environ 30 000 récepteurs pour la colicine K, 6 000 pour les colicines E et moins de 200 pour la colicine A.

- Certaines bactéries peuvent présenter à leur surface davantage de récepteurs pour une colicine donnée que d'autres bactéries. C'est le cas de la souche E. coli B qui possède davantage de récepteurs pour la colicine A que la souche E. coli φ .

- Il y a un rapport entre la vitesse de fixation d'une colicine et le nombre de récepteurs dont elle dispose à la surface de la bactérie.

- Le formol n'inactive pas certains récepteurs des colicines.

- Les souches colicinogènes peuvent fixer la colicine qu'elles produisent, leurs récepteurs ne sont pas saturés pendant la culture.

- Au point de vue pratique, pour un dosage quantitatif, il est indispensable de s'assurer que toute la colicine ajoutée a été fixée. Dans le cas des colicines pour lesquelles les bactéries ont peu de récepteurs, on n'obtient en 20 mn la fixation de toute la colicine qu'en augmentant considérablement la concentration en bactéries.

Pour la suite de nos recherches sur les modifications du métabolisme des bactéries provoquées par les colicines, il est utile de savoir que ces modifications ne peuvent avoir que très peu de points de départ dans le cas de la colicine A, mais un très grand nombre pour la colicine K. Aussi, l'addition d'une forte multiplicité de colicine amplifie l'action biochimique de la colicine K; par contre, une forte multiplicité de colicine A provoque seulement l'accélération de la vitesse de fixation et par là, une action plus rapide.

CHAPITRE III

MODIFICATIONS DU METABOLISME DES PHOSPHOLIPIDES

BACTERIENS LORS DE L'ACTION DES COLICINES.

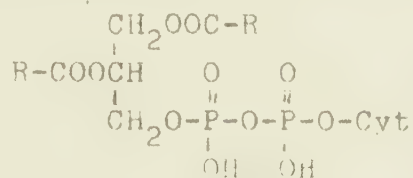
La fixation d'une unité létale de colicine à la surface d'une bactérie sensible déclenche une série de réactions encore inconnues dans leur nature et dans leur suite chronologique, conduisant à la mort de la bactérie. Nous nous sommes demandé si, parmi les toutes premières réactions déclenchées par les colicines, certaines concernaient les lipides et tout particulièrement les phospholipides de la membrane cellulaire.

Le métabolisme des phospholipides d'E. coli a été étudié par KANFER et KENNEDY (1962,1963,1964), STANACEV, CHANG et KENNEDY (1967). Ces auteurs ont montré que l'acide phosphatidique et la phosphatidylsérine (PS) sont des intermédiaires qui ne sont pas accumulés. La phosphatidylsérine donne la phosphatidyléthanolamine par décarboxylation. Tous les phospholipides dérivent de l'acide phosphatidique, via le CDP diglycéride (CDP-DG). Le phosphatidylglycérol, PG, est formé à partir du phosphatidylglycérophosphate obtenu à partir de CDP-DG et de glycérophosphate. Le diphosphatidylglycérol, DPG, est formé à partir de PG et de CDP-DG (schéma).

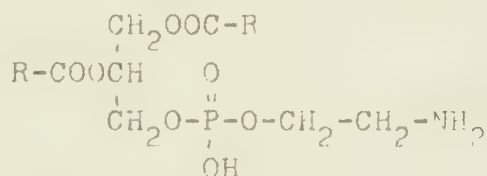
Ces auteurs ainsi que KANEMASA , AKAMATSU et NOJIMA (1967), AMES (1968) ont mis en évidence un turnover des phospholipides, de la partie hydrophile et non pas des acides gras de ces phospholipides. Les phospholipides ayant le turnover le plus rapide sont le PG , puis le DPG , la PE étant stable.

Phospholipides de E.coli

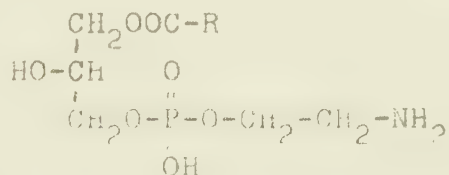
Cytidinediphosphate-diglycérade (CDP-DG)



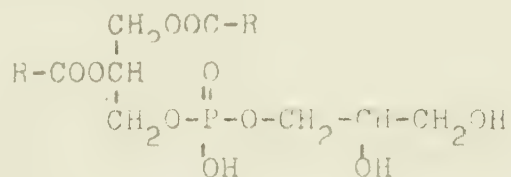
Phosphatidyléthanolamine (PE)



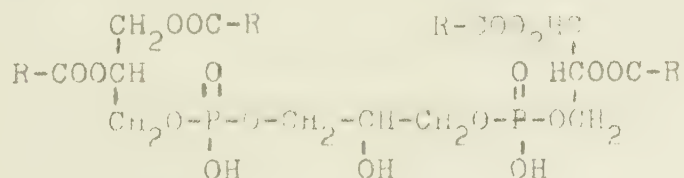
Lysophosphatidyléthanolamine (LPE)



Phosphatidylglycérol (PG)

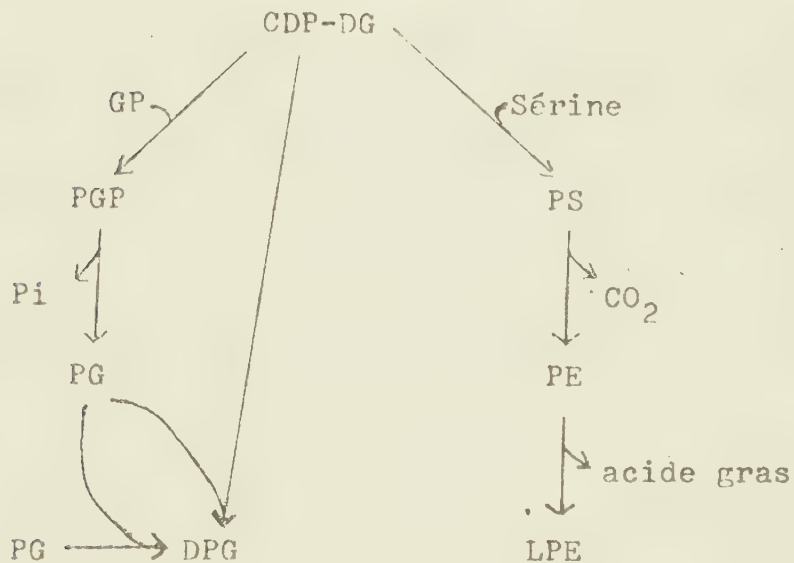


Diphosphatidylglycérol (DPG)



SCHEMA

Synthèse des phospholipides de E.coli



CDP-DG = cytidine diphosphate-diglycérade

PS = phosphatidylsérine

PE = phosphatidyléthanolamine

LPE = lysophosphatidyléthanolamine

GP = glycérphosphate

PGP = phosphatidylglycérphosphate

PG = phosphatidylglycérol

DPG = diphosphatidylglycérol

Nous avons étudié qualitativement et quantitativement, à l'aide du ^{32}P , les conséquences de l'action des colicines sur le devenir des phospholipides préexistants dans les bactéries sensibles, puis sur la synthèse des phospholipides.

De la même façon, nous avons étudié l'action des colicines sur les phospholipides des sphéroplastes. NOMURA et MAEDA (1965) ont montré que les sphéroplastes fixent les colicines et sont plus ou moins sensibles à leur action : ainsi la colicine K arrête la synthèse de la β galactosidase de ces sphéroplastes, la colicine E2 ne provoquant pas la dégradation de l'ADN comme elle le fait chez les bactéries.

I - DEVENIR DES PHOSPHOLIPIDES DES BACTERIES SENSIBLES SOUMISES A L'ACTION DES COLICINES.

1) Mode opératoire

Les bactéries E. coli K12 3000 sont cultivées à 37°C pendant un temps correspondant à huit générations en milieu tryptose 0,5% en présence de ^{32}P 0,1 mC/ml. Elles sont ensuite centrifugées ou filtrées, lavées et remises en suspension dans le milieu de culture. A la suspension bactérienne contenant $2,5 \cdot 10^8$ bactéries par ml, est ajoutée la colicine (1 vol. pour 9 vol. de suspension bactérienne); le mélange bactéries-colicine est laissé 20 mn à 20°C pour permettre à la colicine de se fixer, puis la suspension est mise à incuber à 37°C avec agitation. Le moment où les flacons sont placés dans l'incubateur à 37°C est le temps zéro de nos expériences. A divers moments, des échantillons de 10 ml sont prélevés, refroidis à 0°C et centrifugés à froid. Les lipides sont extraits à partir du culot bactérien selon la technique décrite dans le chapitre I. La radioactivité de chaque phospholipide est déterminée.

2) Résultats.

Nous examinerons successivement ce qui se passe dans les bactéries-témoin, puis dans les bactéries traitées par la colicine.

a) Phospholipides des bactéries témoins

La quantité de ^{32}P contenue dans les phospholipides diminue en fonction du temps d'incubation, comme le montre la figure 12. En 1 h de culture à 37°C , les phospholipides ne perdent que 10 à 15 % de la quantité de ^{32}P initiale.

Dans le tableau X sont représentés les pourcentages de ^{32}P de chaque phospholipide par rapport au ^{32}P des phospholipides totaux. Le PG est le phospholipide qui a le turnover le plus important. Son pourcentage passe de 15 à 6 % en 1 h de culture.

b) Phospholipides des bactéries traitées par les colicines

- ^{32}P des phospholipides totaux

La quantité de ^{32}P contenue dans les phospholipides de bactéries traitées par les colicines A et E2 diminue, en fonction du temps, comme celle contenue dans les phospholipides des bactéries témoins; elle diminue d'une façon plus importante dans les phospholipides de bactéries traitées par la colicine K (fig. 12). Cette diminution peut s'expliquer par un catabolisme accéléré des phospholipides ou par leur passage dans le milieu de culture, ou par ces deux raisons simultanément.

Aussi les lipides ont été recherchés dans le milieu de culture obtenu par centrifugation des suspensions bactériennes. Le milieu de culture est agité mécaniquement avec 4 volumes de mélange chloroforme-méthanol 2-1 (vol/vol). Des phospholipides radioactifs ont pu être identifiés dans la phase solvant obtenue à partir de ce mélange. Ces phospholipides ne sont pas ceux de bactéries ou de fragments bactériens provenant d'une lyse, car ils sont trouvés même après filtration du milieu sur millipore 50 mp. Le ^{32}P des lipides ainsi extraits ne représente que 0,5 à 2 % du ^{32}P du surnageant de centrifugation et 0,5 à 4 % du ^{32}P des lipides bactériens.

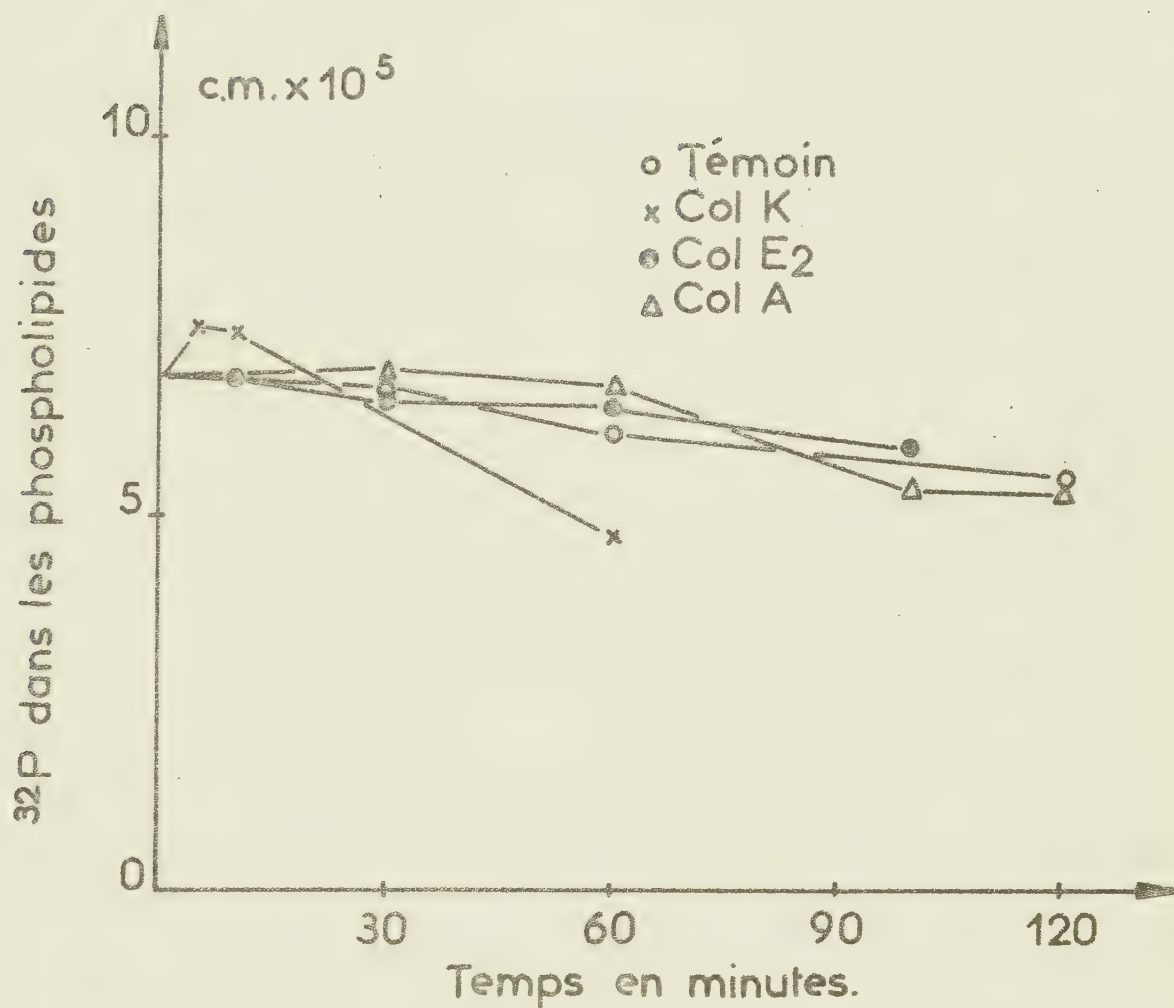


Fig.12. Quantité de ^{32}P dans les phospholipides d'*E. coli* K12 3000 incubé en absence de ^{32}P avec ou sans colicine.

TABLEAU X

Pourcentage de ^{32}P de chaque phospholipide par rapport au ^{32}P de l'ensemble des phospholipides de bactéries E.coli K12 3000 incubées en absence de ^{32}P avec ou sans colicine.

Colicine Multiplicité en U.L.	Durée d'action (mn)	Pourcentage de ^{32}P			
		PE	LPE	PG	DPG
Témoin	0	74	1	15	7
	30	78	1	9	9
	60	80	1,5	5,5	9
Col K 60 U.L.	5	72	1,5	9,5	14
	10	71	2	9	15
	20	70	3	7	17
	30	68	5	6	18
	60	64	6	4	28
	1 U.L.	75	3	6	13
	5 U.L.	71	3,5	5,5	17
100 U.L.	"	69	4,5	5,5	18
Col H 60 U.L.	"	75	3	5,5	13,5
Col Q 60 "	"	74	3	6,5	13,5
Col E1 60 "	"	71	4	7	15
500 "	"	68	5	7	17
Col E2 60 "	"	80	1	8	8
500 "	60	83	1	5	8
	120	85	2	5	5
Col E3 60 "	30	81	1	8	7
500 "	60	78	3	6	10
	120	76	4	4	13
Col A 100 "	30	76	2	7	12
	60	74	3	6	14
	120	74	2	5	16

(x) La radioactivité des phospholipides non étudiés dans ce travail représente environ 3% de la radioactivité totale

- ^{32}P de chaque phospholipide.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'auto-radiogramme 1 et le tableau X. Les pourcentages de LPE et de DPG radioactifs augmentent comparativement à ceux des bactéries témoins lors de l'incubation des bactéries en présence de colicine.

. Pourcentage de LPE

Le pourcentage de ^{32}P dans la LPE passe de 1% à 6% sous l'action de la colicine K. La LPE est formée à partir de la PE radioactive dont la quantité diminue.

La figure 13a représente la variation de la quantité de ^{32}P de la LPE dans les bactéries et dans le milieu de culture. Cette quantité varie très peu dans les bactéries non traitées : elle augmente légèrement vers la 60^{ème} minute car les bactéries atteignent la phase de croissance stationnaire. Par contre, elle augmente rapidement dans les bactéries traitées par la colicine K où elle atteint un taux maximum vers la 30^{ème} minute du traitement. La quantité totale de ^{32}P dans la LPE peut atteindre 10% du ^{32}P trouvé dans l'ensemble des phospholipides.

Au fur et à mesure de la formation de LPE, une quantité de LPE radioactive passe dans le milieu de culture (fig.13b). En effet, la LPE est le principal phospholipide extrait des surnageants de centrifugation des suspensions bactériennes. 30 mn après le début de l'action de la colicine K à 37°C, la quantité de LPE radioactive présente dans le milieu de culture est égale à celle présente dans les bactéries. La polarité de la LPE, son caractère tensio-actif permettent de comprendre son passage dans le milieu après sa formation dans la membrane bactérienne. La LPE trouvée dans le milieu de culture est souvent accompagnée de lysophosphatidylglycérol, LPG (voir autoradiogramme 2): dans la membrane, le LPG est en quantité si faible qu'il ne peut être identifié.

. Pourcentage de DPG.

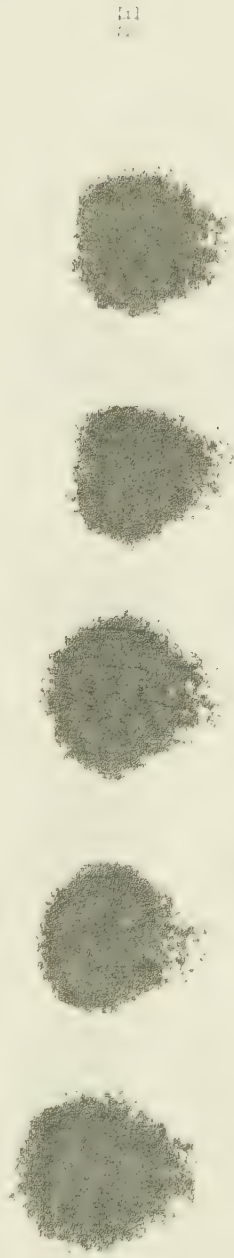
Le pourcentage de ^{32}P contenu dans le DPG par rapport au ^{32}P des phospholipides peut passer de 10 à 18%

AUTORADIOGRAMME I

Chromatographie en phase neutre sur couche mince d'acide silicique
des phospholipides de bactéries E.coli K12 3000 cultivées en présence
de ^{32}P puis incubées sans ^{32}P avec 60 U.I. de phosphatase A.



DPG



PE



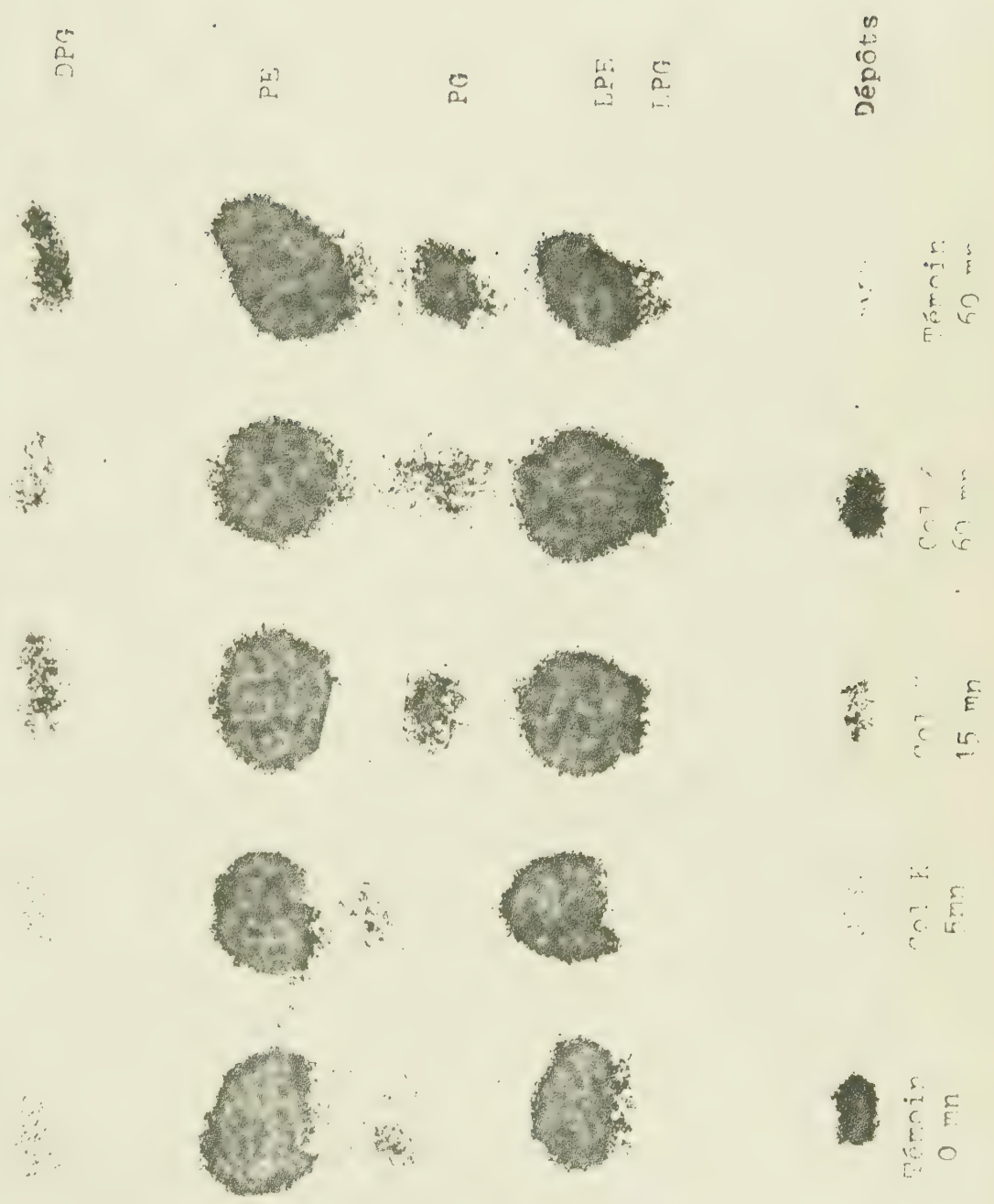
PI

PI



DPG+s

Chromatographie en phase neutre sur couche mince d'acide silicique
de phospholipides extraits du milieu de culture de bactéries E. coli
K12 3000. Ces bactéries ont été cultivées en présence de ^{32} P puis
incubées sans ^{32} P avec 60 U.L. de colicine K.



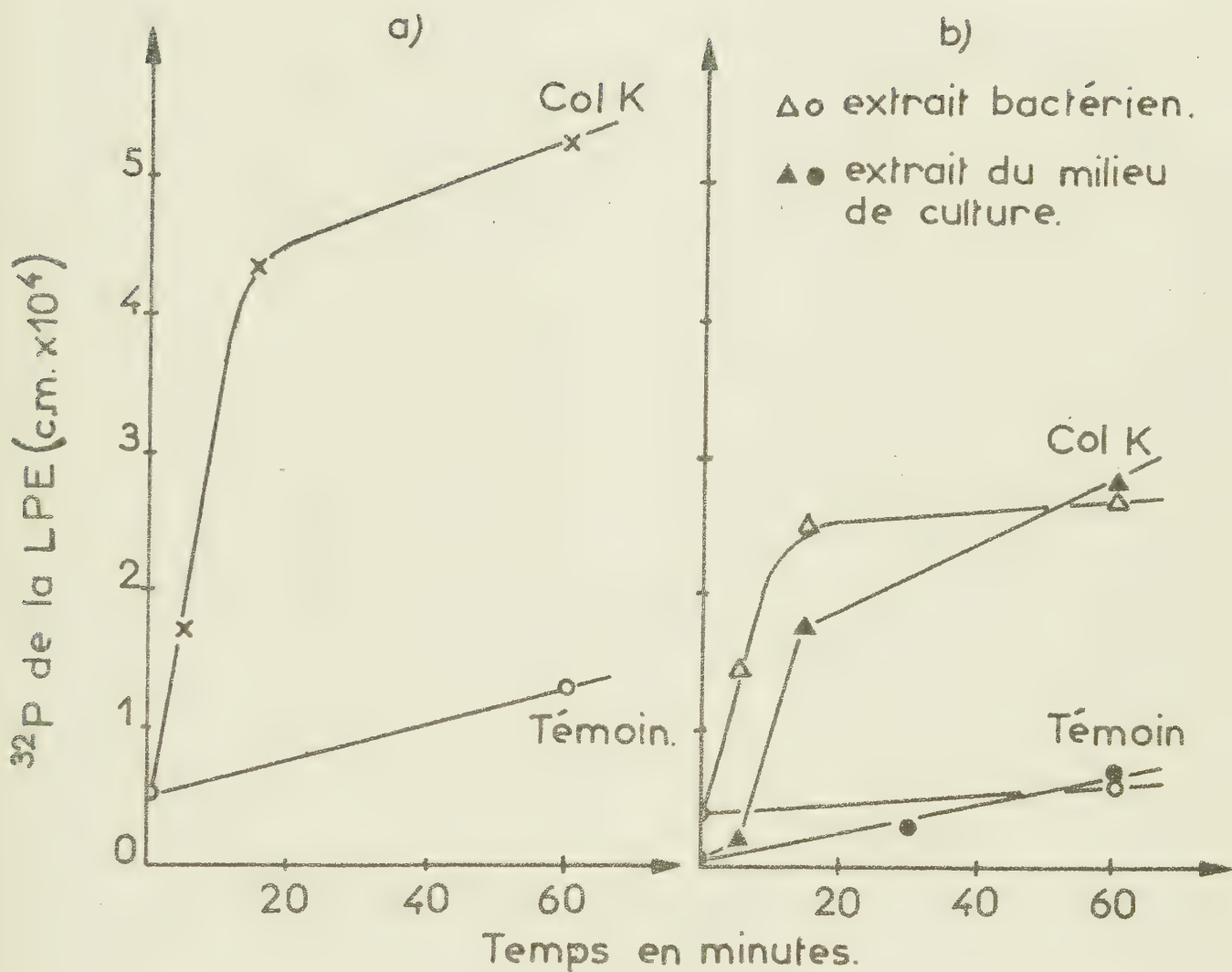


Fig.13. Quantité de ^{32}P contenue dans la LPE de bactéries E.coli K₁₂ 3000 incubées en absence de ^{32}P avec ou sans colicine K.

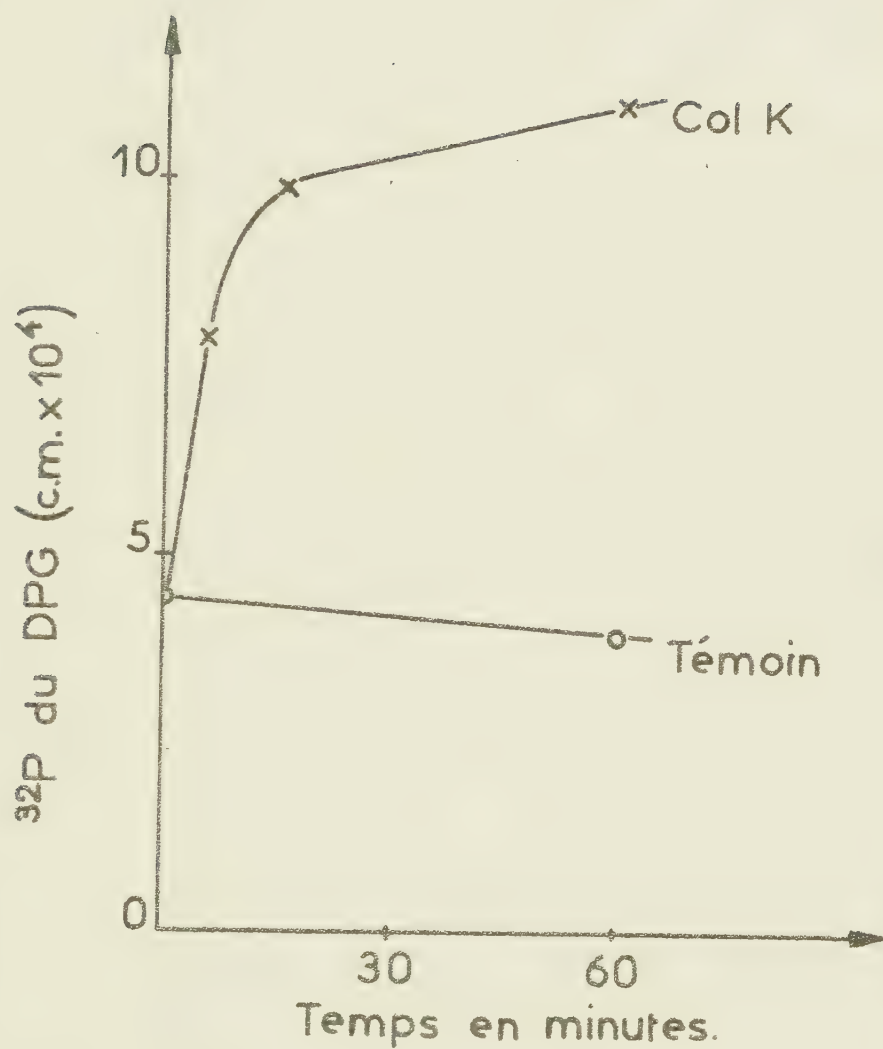


Fig.14. Quantité de ^{32}P contenue dans le DPG de bactéries E.coli K₁₂ 3000 incubées en absence de ^{32}P avec ou sans colicine K.

lors de l'action des colicines. Sur la figure 14 est portée l'augmentation de la quantité de DPG radioactif en fonction de la durée de l'incubation des bactéries avec la colicine K, dans les bactéries témoins et dans les bactéries traitées par la colicine K.

Le DPG n'est trouvé qu'en très faible quantité dans les phospholipides libérés dans le milieu de culture.

3) Influence de différents facteurs.

L'augmentation des taux de LPE et de DPG est fonction de la dose, de la durée de l'action et de la nature de la colicine, comme le montrent les figures 15 et 16 et le tableau X.

a) Influence de la durée d'action de la colicine.

Les augmentations des taux de LPE et de DPG radioactifs commencent très tôt (5 mn) après l'addition de la colicine K (fig. 15). Ces augmentations tendent vers une valeur limite qui est atteinte pour la colicine K en 30 à 40 minutes. Dans le même temps il y a une diminution des proportions de PE et de PG radioactifs. La quantité de LPE radioactive qui passe dans le milieu de culture s'accroît également en fonction de la durée d'action de la colicine.

b) Influence de la quantité de colicine.

Les modifications constatées apparaissent même pour 1 U.L. de colicine K par bactérie. Dans ce cas, la quantité de LPE radioactive double en 30 minutes et celle de DPG augmente d'environ 30 p.100 (fig. 16). Les augmentations des taux de ces deux phospholipides et la vitesse à laquelle elles se produisent sont fonction de la quantité de colicine jusque vers 10 U.L. par bactérie. La multiplicité sert donc à accélérer un phénomène qui se produit lentement avec une seule U.L. par bactérie. Elle sert également à accélérer la vitesse de fixation, ceci est surtout important pour les colicines A et E qui se fixent lentement comme nous l'avons vu précédemment.

c) Influence de la nature de la colicine.

Les colicines E1, H et Q provoquent les mêmes trans-

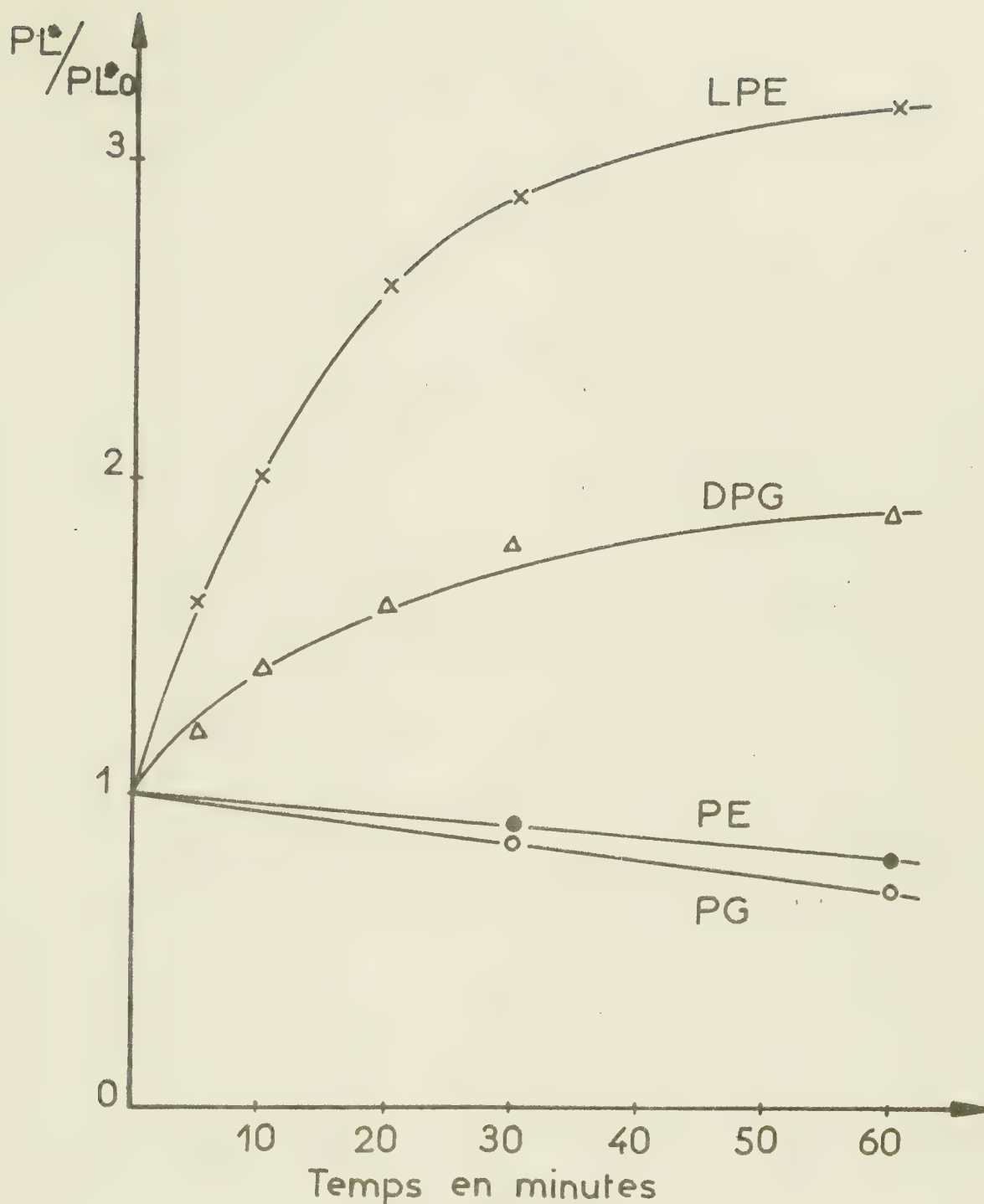


Fig.15.Effet de la durée d'action de la colicine K (60 U.L. par bactérie) sur le devenir des phospholipides radioactifs de E coli K₁₂ 3000.

PL^*/PL_0 : rapport entre les pourcentages de ^{32}P de chaque phospholipide de la bactérie traitée par la colicine (PL^*) et de la bactérie non traitée (PL_0).

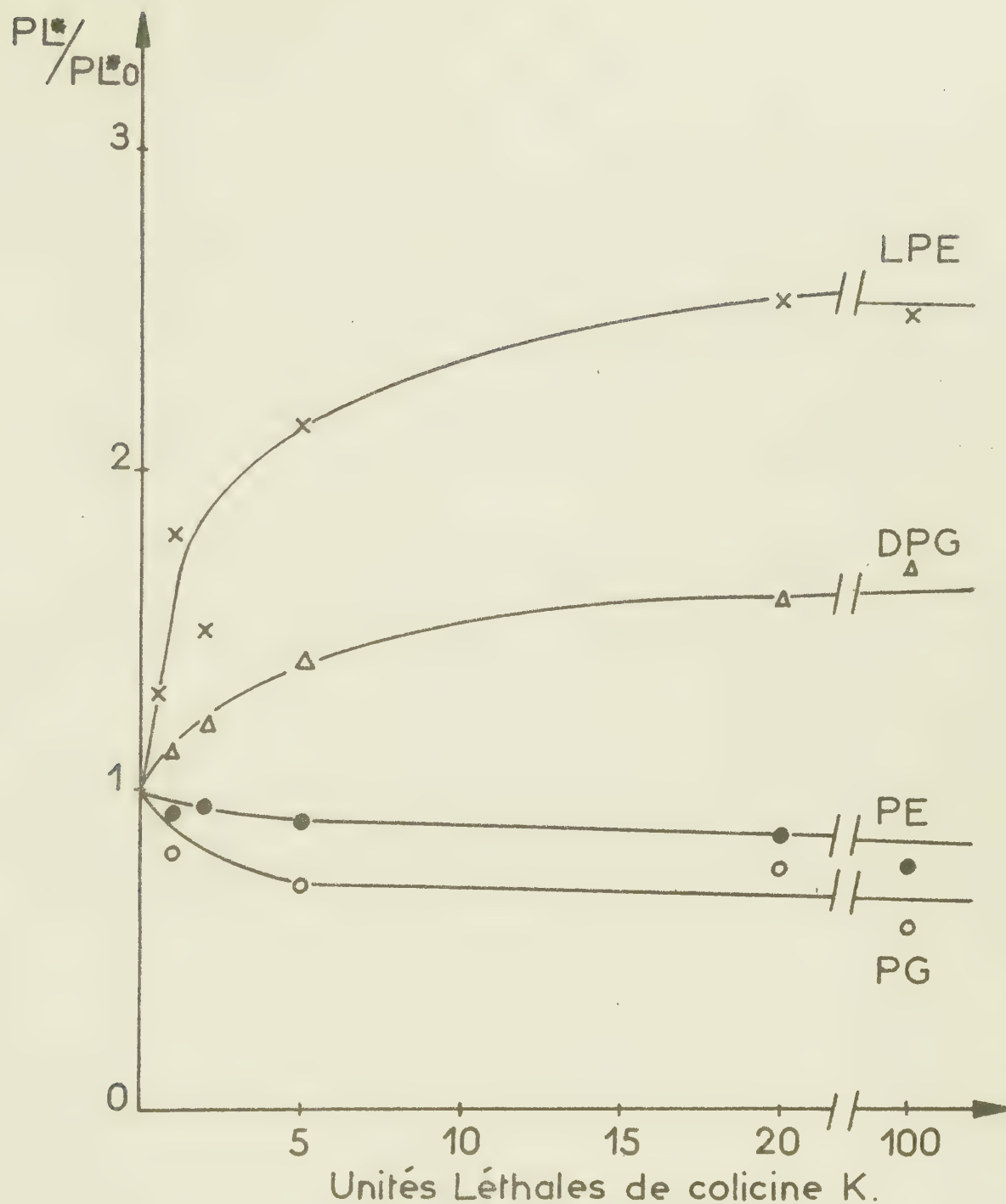


Fig.16. Effet de la dose de colicine K sur le devenir des phospholipides radioactifs d'E.coli K₁₂ 3000.

PL*/PL₀: id. fig.15.

formations que la colicine K avec, à peu près, la même intensité et à la même vitesse(tableau X). Les colicines A et E3 entraînent éralement l'augmentation des proportions de LPE et de DPG radioactifs, mais plus lentement que ne le fait la colicine K: à partir de 30 mn pour la colicine A et de 60 mn pour la colicine E3, et avec des doses très fortes : de 100 à 250 U.L. Seule parmi les colicines testées, la colicine E2 ne provoque pas ces augmentations même pour des doses très fortes et pendant des durées d'action très prolongées : le devenir des phospholipides bactériens est semblable, sous son action, à celui des bactéries non traitées.

La formation de LPE dans les membranes bactériennes lors de l'action des colicines est toujours accompagnée d'une libération de phospholipides et principalement de LPE dans le milieu de culture : tableau XI. Ce phénomène est particulièrement important pour les colicines E1, H, K et Q.

Les colicines n'agissent donc pas toutes de la même façon sur les phospholipides bactériens: il y a une certaine spécificité. Cette spécificité est particulièrement évidente dans le cas des trois colicines E1, E2 et E3, qui se fixent sur le même récepteur bactérien, mais provoquent des modifications du métabolisme des phospholipides assez différentes de l'une à l'autre.

TABLEAU XI

Effet de différentes colicines sur le pourcentage de ^{32}P de la LPE par rapport au ^{32}P des autres phospholipides de E. coli K12 3000. (Bactéries marquées au ^{32}P et incubées en absence de ^{32}P .)

Colicine		Durée d'action (mn)	Pourcentage de ^{32}P dans la LPE		
			des phospho- lipides passés dans le milieu de culture.	des phos- pholipi- des bactériens	des phospho- lipides totaux
Bactéries sans colicine		0	10	0,5	1
		30	23	1	1,5
		60	40	1,5	2
+ Col K	60 U.L.	5	64	1,7	2
		15	71	3	5
		60	84	5	7
+ Col E1	60 U.L.	30	65	5	6,5
+ Col H	"	"	64	3	6
+ Col Q	"	"	79	3,5	6,5
+ Col E2	500 U.L.	"	20	1	1,5

II - SYNTHESE DE PHOSPHOLIPIDES PAR DES BACTERIES SENSIBLES AYANT FIXE DES COLICINES.

1) Mode opératoire.

La préparation de colicine est ajoutée, dans un rapport 1/10 (vol/vol) à une culture en tryptose 0,5% contenant $2,5 \cdot 10^8$ bactéries par ml. Le mélange est laissé 20 mn en contact à 20° C pour que la colicine puisse se fixer. Il est ensuite mis à incuber à 37° C avec agitation au temps zéro porté sur les tableaux et figures.

Le marquage au ^{32}P est effectué de trois manières différentes.

- les bactéries sont cultivées pendant huit générations en présence de ^{32}P et restent en présence de ^{32}P lors de l'action des colicines.
- le ^{32}P est ajouté au moment où les bactéries sont mises à incuber à 37° C.
- Le ^{32}P est ajouté à des temps différents de l'action de la colicine; 10 mn après son addition, les bactéries sont recueillies et leurs lipides extraits.

Dans toutes ces expériences, il est difficile d'étudier la composition du surnageant de centrifugation des bactéries traitées par la colicine car il contient tout le ^{32}P non assimilé par les bactéries. Aussi le milieu de culture est éliminé après centrifugation et les bactéries sont lavées deux fois avec du milieu de culture ou de l'eau physiologique ; puis l'extraction lipidique est effectuée.

Dans ces expériences , on a utilisé les colicines E2 et K. Ces deux colicines ont été choisies en raison de leur action différente sur le devenir des phospholipides radioactifs de E. coli K12 3000. Elles ont été employées à des multiplicités de l'ordre de 60 à 100 U.L. par bactérie.

2) Résultats.

a) ^{32}P ajouté avant et pendant l'action des colicines.

Les bactéries ont été cultivées pendant huit générations en présence de ^{32}P pour que tous les constituants phosphorés des bactéries soient marqués d'une façon homogène. Les bactéries sont laissées en présence de ^{32}P lors de l'addition des colicines. Ainsi peut-on savoir si les modifications obtenues lors des expériences sur le devenir des phospholipides ne sont pas masquées par de nouvelles synthèses

- Colicine K

La colicine K provoque un ralentissement de l'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides des bactéries sensibles : fig 17. Elle provoque un changement dans la proportion des différents phospholipides : augmentation du taux de LPE et de DPG radioactifs (tableau XII). Ces deux phénomènes apparaissent simultanément lors de l'action de la colicine et leur intensité est fonction de la durée d'action de la colicine ou de la dose de colicine.

TABLEAU XII

Pourcentage de ^{32}P dans chaque phospholipide de bactéries E. coli K12 3000 cultivées en présence de ^{32}P avec ou sans colicine

Traitement	Durée d'action des colicines (mn)	Pourcentage de ^{32}P dans			
		PE	LPE	PG	DPG
Bactéries-témoins	0	79	1	14	6
	30	78	1	14	6
	60	79	1,5	13,5	6
Bactéries+ colK	10	79	2	11	8
	30	80	3	8	9
	60	77	4	7	12
Bactéries + Col E2	30	77	1	15	7
	60	78	1	15	6

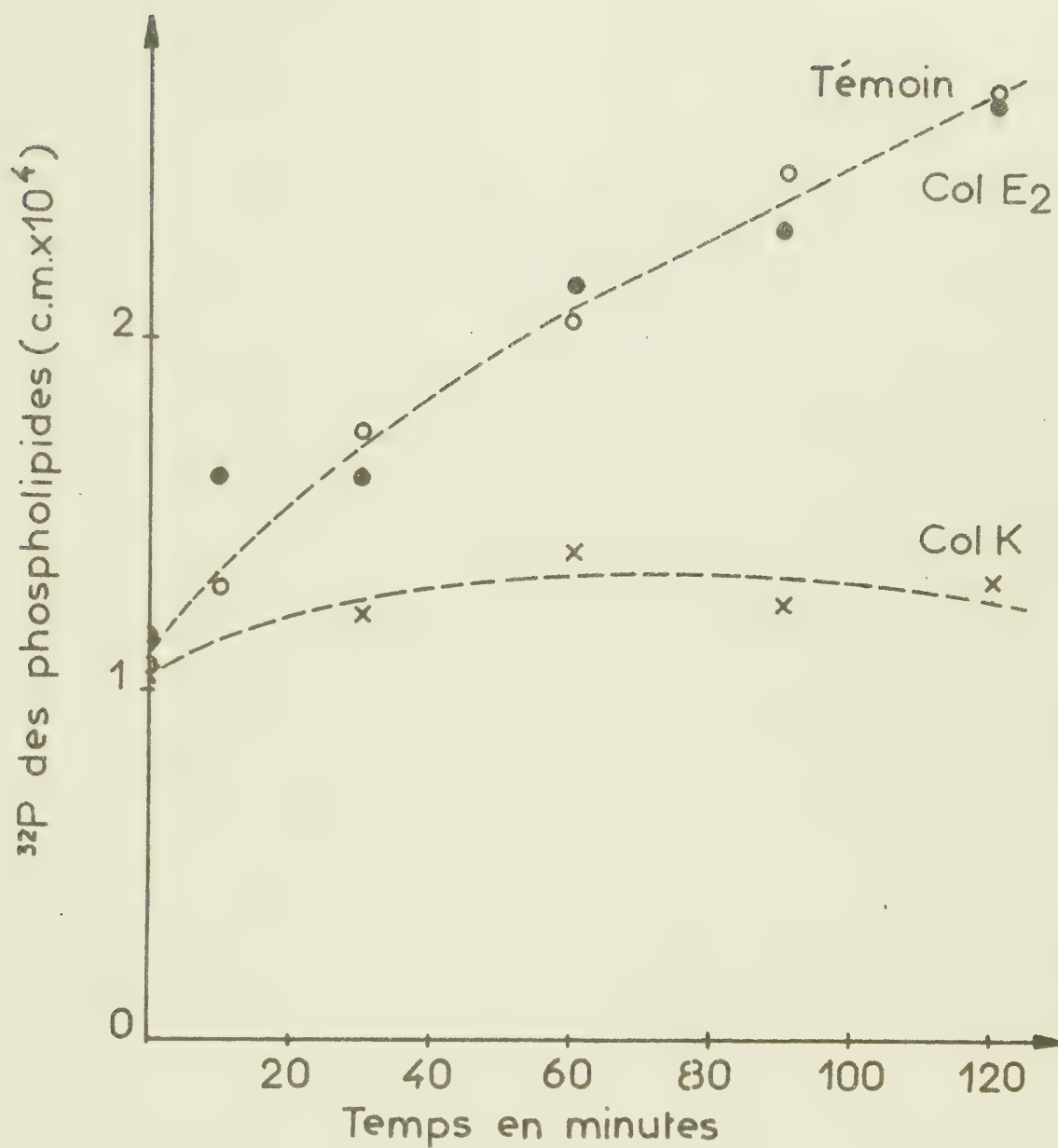


Fig.17. Incorporation de ^{32}P dans les phospholipides d'*E. coli* K₁₂ 3000.

Les bactéries ont été cultivées en présence de ^{32}P .

- Colicine E2

La colicine E2 ne provoque aucun ralentissement de l'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides bactériens (fig. 17).

Pendant les 60 premières minutes de son action, l'incorporation de ^{32}P représente 85 à 120% de celle obtenue dans les bactéries non traitées. Or, les bactéries traitées par la colicine E2 ne se multiplient plus, alors que les bactéries-témoins continuent leur développement, une génération nouvelle apparaissant toutes les 30 minutes environ. Les synthèses des phospholipides ne semblent donc pas être affectées par la colicine E2, mais semblent échapper à leur régulation, n'étant plus en relation avec la division cellulaire.

Les proportions des différents phospholipides ainsi synthétisés restent constantes quelle que soit la durée de l'action de la colicine, de 10 à 100 minutes. Elles sont très semblables à celles trouvées dans les bactéries-témoins (tableau XII).

b) ^{32}P ajouté au début de l'action des colicines.

Le ^{32}P est ajouté au milieu de culture au temps zéro de l'incubation des bactéries à 37° C. La cinétique de l'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides est représentée dans la figure 18.

- Colicine K

L'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides bactériens est fortement ralentie lors de l'action de la colicine K et ce, dès les premières minutes de cette action. En 5 mn, l'incorporation est 10 à 15 fois plus faible que celle des bactéries sans colicine.

Les proportions des phospholipides synthétisés (tableau XIII) sont différentes de celles des bactéries-témoins par la présence d'un constituant que nous n'avons pas encore identifié. Il possède un Rf de 0,13 sur chroma-

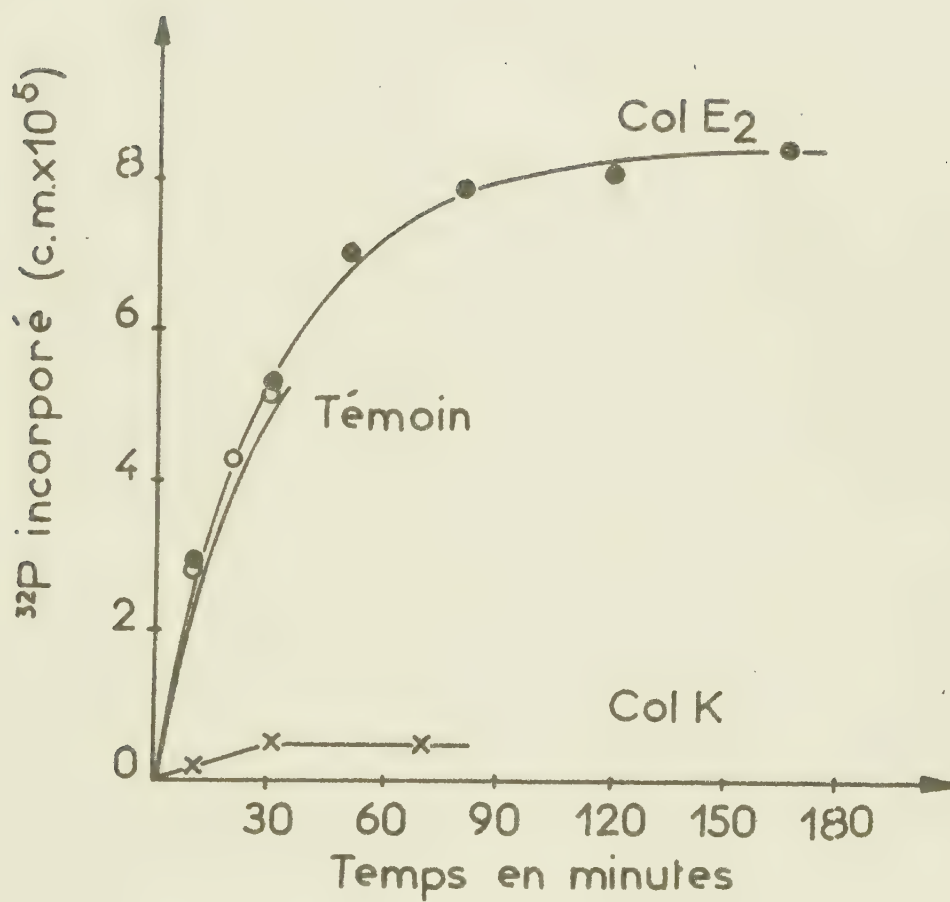


Fig.18. Incorporation de ^{32}P dans les phospholipides de bactéries *E. coli* K12 3000 incubées avec ou sans colicine.

toprogramme d'acide silicique en phase neutre , c'est-à-dire qu'il est plus hydrophile que le PG et même que la LPE. Sa synthèse est assez importante car sa radioactivité représente 7% de celle des autres phospholipides après 5 mn d'action de la colicine K, 16% après 30 mn et 20% après 70 mn.

- Colicine E2

L'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides des bactéries traitées par la colicine E2 est , dans les 30 premières minutes de l'incubation , semblable à celle des bactéries non traitées (figure 18). (dans certaines expériences cette incorporation est plus importante que celle des bactéries-témoins). Elle se ralentit vers la 50ème minute, mais est encore importante même après 120 mn. Ainsi les bactéries dont la division est arrêtée par la colicine E2 continuent à synthétiser des phospholipides de la même façon que des bactéries qui se multiplient normalement.

Les proportions des différents phospholipides (tableau XIII) sont celles des bactéries non traitées par la colicine.

c) ^{32}P ajouté, pendant 10 mn, à divers moments après le début de l'action des colicines.

Le ^{32}P est ajouté aux bactéries à différents moments de l'incubation ; 10 mn après l'addition du ^{32}P , les cultures sont refroidies, centrifugées , lavées et les lipides sont extraits et analysés.

TABLEAU XIII

Synthèse de phospholipides radioactifs par E. coli K12 3000 en fonction de la durée d'action des colicines K et E2.

Traitement	Durée d'incor- poration ^{32}P (mn)	Pourcentage de ^{32}P			
		PE	PG	DPG	Constituant non identifié.
Bactéries témoins	10	72	22	6	
	30	76	17	7	
Bactéries + colK	10	51	17	5	7
	30	63	15	6	16
	70	54	16	9	21
Bactéries+col E2	10	73	22	5	
	30	75	19	6	
	70	74	19	7	

Colicine K

Les résultats sont portés dans le tableau XIV. La quantité de ^{32}P incorporée est, dès les premières minutes, de l'ordre de 20 à 10% de celle incorporée par les bactéries-témoins. Les phospholipides ainsi synthétisés sont les mêmes que ceux des bactéries témoins mais les synthèses de LPE et de DPG augmentent avec la durée de l'action de la colicine.

TABLEAU XIV

Phospholipides radioactifs synthétisés en 10 mn par E. coli K12 3000.

Temps de l'incubation pendant lequel est ajouté le ^{32}P	^{32}P incorporé dans les lipides (c.m.)	Pourcentage de ^{32}P			
		PE	LPE	PG	DPG
Bactéries témoins					
0 à 10 mn	2,75 10^5	72	1,5	22	4,5
25 à 35 mn	4,30 "	73	1,5	22	3,5
Bactéries + col K					
0 à 10 mn	0,55 10^5	69	2,5	27	3,5
25 à 35 mn	0,29 "	77	4,3	11	7

- Colicine E2

Les synthèses des phospholipides loin d'être arrêtées par l'action de la colicine E2 restent aussi importantes que celles

des bactéries témoins : figure 19. Elles restent importantes même 3h. après le début de l'action de la colicine E2.

Les proportions des différents phospholipides radioactifs synthétisés en 10 mn varient en fonction du temps d'action de la colicine E2 : tableau XIV. La proportion de ^{32}P dans la PE, égale à celle des bactéries témoins pendant les 10 premières minutes de l'action de la colicine, diminue progressivement en fonction du temps pour n'être plus que de 30% entre 150 et 160 mn: la proportion de PG est, inversement, de plus en plus importante.

TABLEAU XV

Phospholipides radioactifs synthétisés en 10 mn par E.coli K12 3000 lors de l'action de la colicine E2.

Temps de l'incubation pendant lequel est ajouté le ^{32}P	Pourcentage de ^{32}P			
	PE	LPE	PG	DPG
Bactéries témoins				
0 à 10 mn	72	1	23	4
Bactéries + colicine E2				
0 à 10 mn	73	1	23	3
15 à 25 "	57	1	39	3
30 à 40 "	53	1	43	3
50 à 60 "	44	0,5	51	3,5
75 à 85 "	38	0,5	57	3,5
105 à 115 "	37	0,5	60	3
150 à 160 "	35	-	61	3

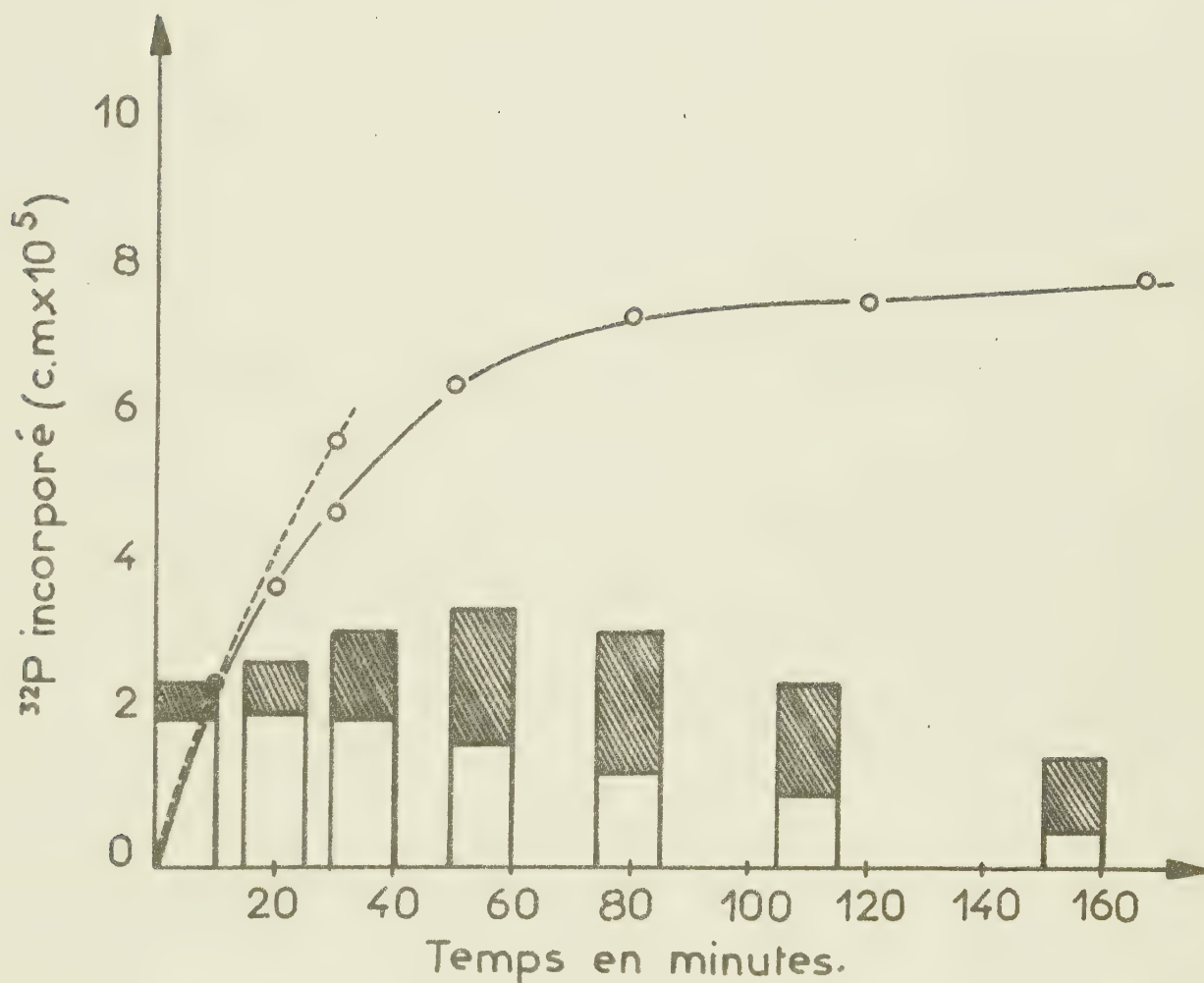


Fig.19. Incorporation en 10 mn. de ^{32}P dans les phospholipides d'E.coli K₁₂ 3000 lors de l'action de la colicine E₂.

En hachuré incorporation de ^{32}P dans le PG.

III - MODIFICATIONS DU METABOLISME DES PHOSPHOLIPIDES DES SPHEROPLASTES SOUS L'ACTION DES COLICINES .

L'action des colicines sur les sphéroplastés ne peut être contrôlée par l'arrêt de la multiplication, les sphéroplastés ne se divisent pas. Les phospholipides des bactéries sensibles étant transformés sous l'action des colicines , nous nous sommes demandés s'il en était de même pour les phospholipides des sphéroplastés obtenus à partir de ces bactéries sensibles, et si la présence d'un support rigide , la paroi ou cell-wall, ne freinait pas ces transformations.

1) DEVENIR DES PHOSPHOLIPIDES DES SPHEROPLASTES SOUS L'ACTION DES COLICINES .

a) Mode opératoire.

La transformation des bactéries en sphéroplastés se fait en absence de ^{32}P sur des bactéries qui ont été cultivées pendant huit générations en présence de ^{32}P . Le protocole expérimental est ensuite le même que celui utilisé pour les bactéries. Cependant l'extraction des lipides est faite sur une suspension et non sur un culot de sphéroplastés : l'extrait obtenu contient ainsi réunis les phospholipides des sphéroplastés et les phospholipides qui ont été, éventuellement , libérés dans le milieu de culture.

b) Résultats.

- Bactéries témoins

Nous avons étudié tout d'abord le devenir des phospholipides de bactéries incubées dans les mêmes conditions que les sphéroplastés , c'est-à-dire dans un milieu contenant 20% de saccharose, à une concentration correspondant à une d.o. de 1.

Ces bactéries présentent un taux de DPG très élevé (tableau XVI). Le ^{32}P contenu dans le DPG représente 30% du ^{32}P de l'ensemble des phospholipides. Les bactéries incubées en absence de source d'énergie ont un taux de DPG supérieur à celui des bactéries en tryptose 0,5%. Le taux de LPE de ces bactéries est également plus élevé que la normale.

TABLEAU XVI

Devenir des phospholipides de sphéroplastes et de bactéries
E.coli K12 3000 incubés dans les mêmes conditions.

Traitement à 37°C	Durée d'incubation (mn)	Pourcentage de ^{32}P			
		PE	LPE	PG	DPG
Tris M/150. Saccharose 20%. MgCl_2 M/100	0	59			
Bactéries témoins	30	55	1,5	10	29,5
	60	54	3	8	34
Bactéries + colicine K	10	55	3	6	37
	30	52	3	8	30
	60	54	4	7	34
Sphéroplastes témoins	0		3	5	37
	30	63	6	10	21
	60	62	5	8	25
Sphéroplastes + col K	120	59	5	9	27
	10	59	8	10	24
	30	60	9	5	25
	60	59	9	4	26
	120	60	7	4	28
Tryptose 0,5%. Saccharose 20%.		57	8	4	26
Bactéries témoins	0				
	30	63	1	11	25
Bactéries + col K	60	60	2,5	8,5	29
	10	59	4,5	9	29
	30	59	2,5	6	32,5
	60	53	3,5	5,5	38
Sphéroplastes témoins		51	4	3	42
	0				
	30	66,5	3,5	7	23
	60	66	4	6	24
Sphéroplastes + col K	120	65	5	6	24
	10	69	5	6	20
	30	61	7	4	27
	60	60	7	4	27
	120	59	7	4	28
		59	6	4	26

- Sphéroplastes - témoins .

La radioactivité totale des phospholipides des sphéroplastes diminue, en fonction du temps (fir.20), plus rapidement que celle des bactéries.

Les pourcentages de ^{32}P dans chaque phospholipide des sphéroplastés sont portés dans le tableau XVI. La transformation des bactéries en sphéroplastés provoque une augmentation importante du taux de LPE radioactive. Le taux de DPG radioactif est par contre égal ou légèrement inférieur à celui des bactéries témoins.

- Bactéries + colicine

La colicine K ne provoque aucune transformation des phospholipides, lorsque les bactéries sont incubées en absence de source d'énergie. Lorsqu'elles sont incubées en présence de tryptose 0,5% les taux de DPG et de LPE radioactifs augmentent lors de l'action de la colicine K (tableau XVI). Ceci est contraire à la protection des bactéries contre les colicines par une forte pression osmotique observée par Beppu et Arima, (1967)

- Sphéroplastés + colicine

La colicine K ne provoque un changement dans le devenir des phospholipides des sphéroplastés que lorsque ceux-ci sont incubés en présence d'une source d'énergie : il y a alors augmentation des taux de DPG et de LPE; l'augmentation du taux de DPG est moins importante que celle obtenue chez les bactéries.

La colicine E2 ne provoque aucune transformation des phospholipides des sphéroplastés.

2) SYNTHÈSES DES PHOSPHOLIPIDES PAR LES SPHEROPLASTES LORS DE L'ACTION DES COLICINES .

Les techniques sont les mêmes que celles utilisées pour les bactéries.

a) ^{32}P ajouté au début de l'action des colicines

La colicine K ralentit l'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides. Lors de l'action de la colicine E2, l'incor-

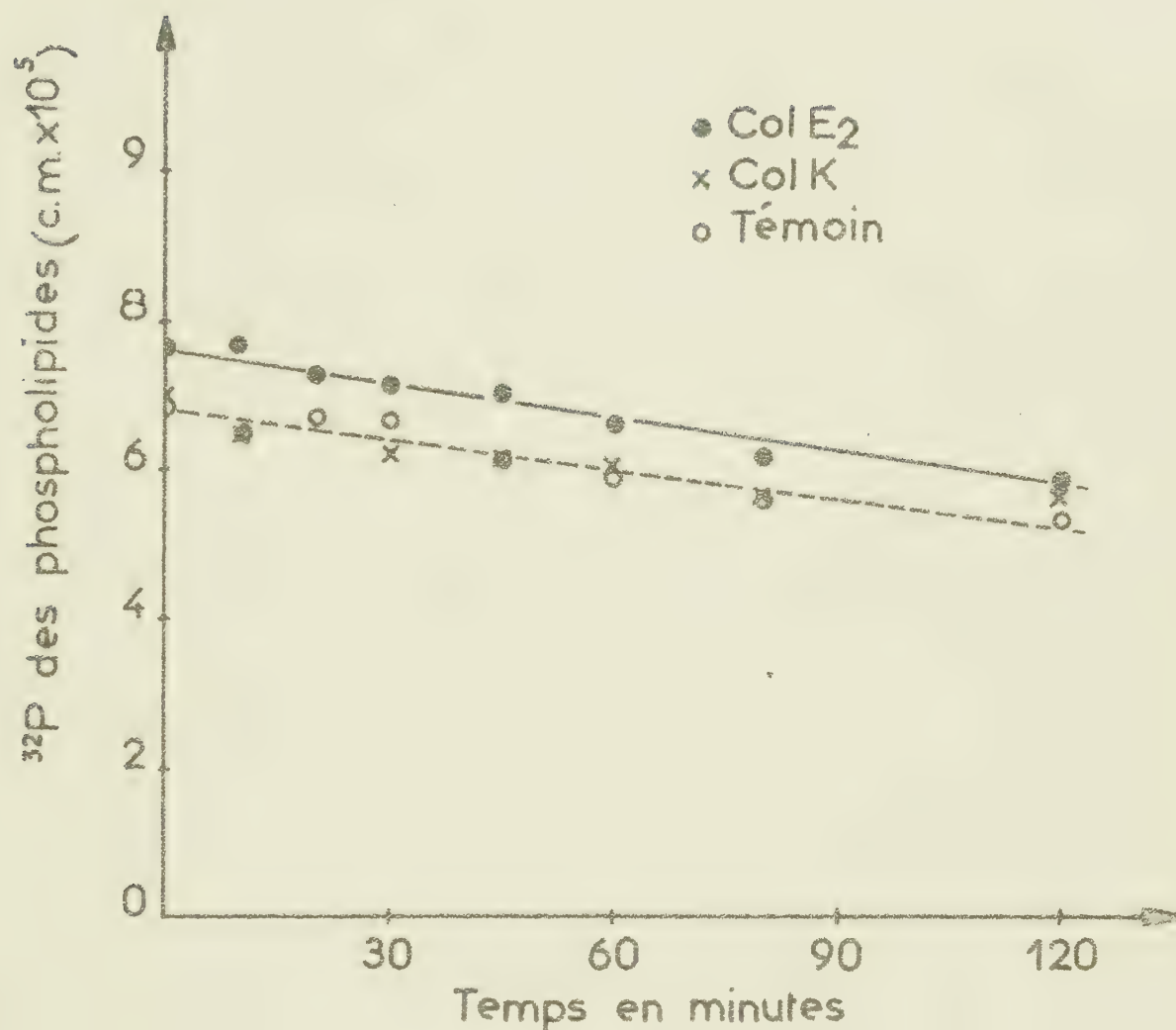


Fig.20. Quantité de ^{32}P dans les phospholipides des sphéroplastes d'E.coli K₁₂ 3000 incubés avec ou sans colicine, en absence de ^{32}P .

poration de ^{32}P reste semblable à celle des sphéroplastes témoins (fig.21).

Les taux de synthèse de chaque phospholipide sont présentés dans le tableau XVII. Chez les sphéroplastes témoins, le PG et le DPG sont synthétisés en grande quantité ainsi que le phospholipide non identifié dont nous avons signalé la synthèse par les bactéries lors de l'action de la colicine K.

Le taux de synthèse de chaque phospholipide des sphéroplastes reste inchangé lors de l'action de la colicine E2. Par contre , lors de l'action de la colicine K, il y a une augmentation du taux de ^{32}P dans le DPG et dans le phospholipide non identifié.

TABLEAU XVII

Synthèse de phospholipides radioactifs par les sphéroplastes d'E. coli K12 3000 lors de l'action des colicines E2 ou K.

Colicine	Durée d'incorpora- tion du ^{32}P et d'action des colici- nes (mn)	Pourcentage de ^{32}P dans				
		PE	LPE	PG	DPG	Phospholi- pide non identifié
Témoin	12	48	6	26	13	7
	32	51	3	26	15	5
Colicine E2	12	45	7	25	13	10
	32	53	3	25	14	5
	58	54	2	25	13	6
Colicine K	12	19	4	33	17	27
	32	24	3	27	25	21
	58	21	2	21	33	23

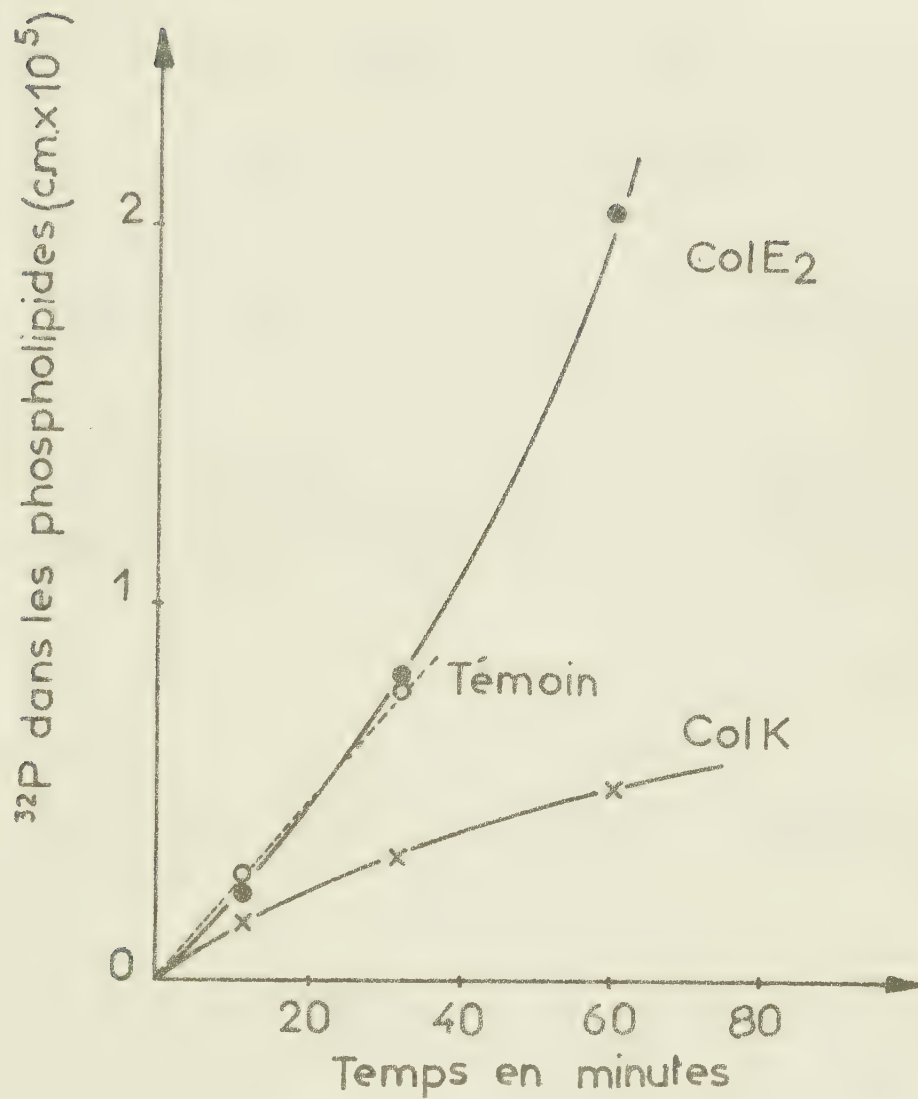


Fig.21. Incorporation de ^{32}P dans les phospholipides des sphéroplastés d'E.coli K12.3000 incubés en présence de colicine E₂ ou K.

b) ^{32}P ajouté, pendant 10 mn, à divers moments après le début de l'action des colicines.

Le ^{32}P est ajouté aux sphéroplastés à différents moments de l'incubation; 10 mn après l'addition du ^{32}P , les lipides sont extraits et analysés.

L'incorporation de ^{32}P est plus faible dans les sphéroplastés traités avec la colicine K que dans les sphéroplastés non traités ou dans ceux traités avec la colicine E2 (tableau XVIII).

Les proportions de PG et de DPG synthétisés sont plus élevées que dans les bactéries. La synthèse relative du PG est considérablement accrue après 15 mn d'action de la colicine K et 60 mn d'action de la colicine E2; le taux de ^{32}P dans le PG atteint alors 60% du ^{32}P de l'ensemble des phospholipides.

TABLEAU XVIII

Synthèse en 10 mn de phospholipides radioactifs par des sphéroplastés de E. coli K12 3000 en fonction de la durée d'action des colicines K et E2.

Temps de l'incubation pendant lequel est ajouté le ^{32}P	^{32}P incorporé dans les phospholipides (c.m.)	Pourcentage de ^{32}P				
		PE	LPE	PG	DPG	Phospholipide inconnu
Sphéroplastés témoins						
0 à 10 mn	35 10^3	59	4	19	15,5	2,5
Sphéroplastés + col K						
0 à 10 mn	19 10^3	33	4,5	24,5	25	13
15 à 25 "	7 "	15	-	65	12	8
Sphéroplastés + col E2						
0 à 10 mn	30 10^3	60	5	17	14	4
15 à 25 "	8 "	54	4	22	12	8

DISCUSSION.

Lors de l'action des colicines, le métabolisme des phospholipides bactériens est perturbé. Les colicines peuvent être classées en 2 groupes selon leur type d'action sur ce métabolisme.

1) Les colicines qui arrêtent la plus grande partie des synthèses des phospholipides et qui provoquent une augmentation des taux de LPE et de DPG parmi les phospholipides préexistants dans la bactérie et les phospholipides néosynthétisés. Les colicines E1, et K sont les représentantes de ce groupe qui provoquent ces transformations avec la plus grande intensité et la plus grande vitesse: les colicines A, E3, H et Q en font également partie.

2) Les colicines qui n'arrêtent pas les synthèses des phospholipides et qui ne provoquent pas de transformation des phospholipides préexistants dans la bactérie; leur action sur le métabolisme des phospholipides porte sur la régulation de celui-ci: d'une part, les synthèses des phospholipides sont aussi importantes que dans les bactéries normales bien que n'étant plus en rapport avec la division cellulaire; d'autre part les synthèses des phospholipides réalisées en 10 mn sont plus importantes que le laissent prévoir les synthèses suivies par l'incorporation continue de ^{32}P . De plus, lors de ces synthèses en 10 mn, le pourcentage de ^{32}P du PG augmente avec la durée de l'action de la colicine pendant que celui de la PE diminue.

Nous allons essayer d'interpréter ces deux types d'action sur le métabolisme phospholipidique.

1) Groupe des colicines représentées par les colicines K et E1.

Les augmentations des taux de DPG et de LPE lors de l'action des colicines de ce groupe constituent des événements biochimiques importants, car elles doivent provoquer des modifications de la structure de la membrane et par là, perturber son fonctionnement.

Les deux phospholipides dont les taux sont augmentés, ont des propriétés physiques et chimiques très différentes. Le DPG est le phospholipide le plus acide, il contient deux groupements phosphoriques. C'est le phospholipide le plus hydrophobe: il contient 4 chaînes d'acides gras. Aussi l'augmentation de son taux dans la membrane peut avoir des répercussions sur les interactions lipides-protéines ou lipides-lipides, ou même protéine-protéine, et conduire à une plus grande viscosité de la membrane, gênant (ou empêchant) les mouvements de celle-ci et les échanges ou les transports moléculaires qui y ont lieu.- La LPE est au contraire le phospholipide le moins hydrophobe : il n'a qu'une chaîne grasse , une partie hydrophile importante, pouvant posséder une charge électrique négative (la fonction acide non estérifiée de l'acide phosphorique) et une charge positive : la fonction amine de l'éthanolamine, Aussi la LPE a des propriétés détergentes, pouvant modifier d'une façon importante la perméabilité de la membrane en agissant sur les autres lipides et favorisant la formation de micelles lipidiques. Cette action détergente doit donc également modifier les interactions lipides protéines, lipides-lipides et peut-être même protéines-protéines de la membrane.

L'augmentation du taux de LPE au détriment du taux de PE peut être la conséquence soit de l'activité d'une phospholipase A, soit de l'arrêt de l'activité d'une lysophospholipase ou d'une acyltransférase : dans ces derniers cas, on suppose que la formation de LPE chez les bactéries normales est suivie d'une dégradation en glycérylphosphoryléthanolamine ou d'une synthèse de PE à partir de 2 LPE ou de LPE et d'un acyl-co-enzyme A, la formation de l'acyl-co-enzyme A requérant de l'énergie. PROULX et van DEENEN (1966, 1967) ont montré la présence chez E.coli de phospholipase C, de lysophospholipase et d'acyl-co- A-phospholipide acyltransférase ; OKUYAMA et NOJIMA (1969) la présence d'une phospholipase A ; l'activité de ces enzymes a été démontrée in vitro. Les travaux de RAMPINI, LUX, CAVARD et BARBU (1969) ont mis en évidence l'action in vivo de la phospholipase A d'E. coli. Ainsi tous les enzymes nécessaires sont présents chez E. coli. Le fait que l'augmentation du taux de LPE soit limitée lors de

L'action des colicines ou lors de la formation des sphéroplast est plus en faveur de l'activité d'une phospholipase que de l'inhibition d'une acyltransférase ou d'une lysophospholipase.

Pour une bactériocine, la mégacine A, OZAKI et coll. (1966) ont mis en évidence *in vitro* une activité phospholipasique A. Nous avons cherché à savoir si les colicines n'avaient pas directement une telle activité en les mettant au contact de PE ou de PG. Aucune activité phospholipasique n'a pu être constatée, ce qui n'exclut pas que la colicine puisse acquérir une activité enzymatique après interaction avec son récepteur *in situ*. Toutefois, il faut signaler que les colicines et la mégacine A agissent de façons très différentes : la mégacine A n'a pas besoin de récepteur pour agir et elle provoque la lyse des sphéroplast (IVANOVICS et coll. 1959).

Le passage d'une partie de la LPE dans le milieu de culture est imputable à son caractère détergent. Dans les expériences concernant les sphéroplast, nous n'avons pas extrait séparément les lipides des sphéroplast et les lipides du milieu de culture. Nous nous sommes demandé si la LPE trouvée dans les sphéroplast ne provenait pas de la lyse de certains sphéroplast. Ceux-ci sont en effet fragiles et certains peuvent se lyser au cours des lavages et des centrifugations. Les sphéroplast intacts ayant un taux faible de LPE, analogue à celui des bactéries, auraient un taux de LPE augmenté lors de l'action des colicines.

L'augmentation du taux de DPG lors de l'action des colicines K et E1 peut être la conséquence d'une synthèse accrue de DPG à partir du PG ou d'un arrêt de la dégradation du DPG ou de ces deux phénomènes simultanément. La concentration du PG diminue lors de l'augmentation du taux de DPG. Le PG a un turnover indépendant du DPG : ce turnover serait arrêté au profit de la synthèse du DPG lors de l'action des colicines. Le DPG possède un turnover (RAMPINI et coll. 1970) et il se peut que celui-ci soit arrêté, tout du moins en partie. C'est ce qui doit se passer dans les sphéroplast ou dans les bactéries incubées dans les mêmes conditions que les sphéroplast : le taux de DPG est alors trop élevé pour provenir en totalité du PG qui a disparu. Dans ces conditions, c'est l'incu-

bation d'une forte densité de bactéries dans un milieu contenant 20% de saccharose qui provoque une augmentation très importante du taux de DPG. Ces deux facteurs : forte densité bactérienne et viscosité du milieu, doivent gêner la croissance cellulaire et surtout les échanges respiratoires. Un mauvais fonctionnement des chaînes respiratoires peut se traduire par un changement de composition des lipides de la membrane et particulièrement par une augmentation du taux de DPG. (Chap.V) BARBU (résultats non publiés) a constaté que *E. coli* cultivé en anaérobiose présentait une concentration élevée de DPG. Dans les expériences avec les sphéropastes et les bactéroés-témoins, la plus grande concentration de DPG est obtenue lorsque l'incubation se fait dans un milieu sans source d'énergie: les conditions d'une phase de croissance stationnaire sont alors réalisées. Dans ces conditions, les colicines ne provoquent pas de transformations des phospholipides bactériens. Nous interpréterons ce phénomène dans la discussion finale

L'arrêt de la plus grande partie des synthèses des phospholipides provoqué par les colicines E1 et K peut être dû à l'arrêt des oxydations phosphorylantes des bactéries traitées par ces colicines, lui-même dû aux transformations des phospholipides. FIELDS et LURIA (1969) ont montré que, lors de l'action de ces colicines , le taux d'ATP synthétisé diminue considérablement; l'ATP n'est plus fourni par le fonctionnement de la chaîne respiratoire: les bactéries ne peuvent utiliser que l'ATP fourni par d'autres voies telles que la glycolyse. Ceci explique également l'arrêt des synthèses des protéines et des acides nucléiques (NOMURA et MAEDA, 1965).

Les autres colicines de ce groupe ont une même action. NAGEL et ZWATG (1969) a montré que la colicine A agit aussi sur les bactéries en les privant d'énergie. Il doit en être de même pour les colicines H et Q.

2) Colicine E2.

Le devenir et la synthèse de novo des phospholipides des bactéries traitées avec la colicine E2 sont semblables

à ceux des bactéries non traitées, pendant une durée d'une génération bactérienne. Ceci est assez surprenant car la division cellulaire est arrêtée chez les bactéries traitées par la colicine E2.

Toutefois, la colicine E2 provoque des modifications du métabolisme des phospholipides, comme le révèlent les expériences de pulse de ^{32}P de 10 mn. En effet, par ces expériences, une synthèse importante de phospholipides est mise en évidence même 1h ou 2h après le début de l'action de la colicine; cette synthèse n'est pas apparente lors des marquages continus avec le ^{32}P (fig 19). Ce fait suggère que les phospholipides subissent un turnover important. Or, cette conclusion est en contradiction avec les résultats obtenus sur le devenir des phospholipides : en présence de colicine E2, le turnover des phospholipides préexistants dans les bactéries est semblable à celui des bactéries sans colicine. Pour interpréter cette contradiction, on peut faire l'hypothèse que les phospholipides nouvellement synthétisés en présence de colicine E2 sont préférentiellement dégradés. Ceci, soit à cause de leur emplacement dans la cellule, soit à cause de leur nature particulière. En effet, lors des synthèses de 10 mn, le pourcentage de ^{32}P du PG augmente avec la durée de l'action de la colicine, celui de la PE diminue. Cette diminution de la quantité de PE formée doit être le résultat d'une synthèse réduite et non d'une dégradation accrue, car le taux de PE diminuerait également lors des synthèses suivies par une incorporation continue de ^{32}P , ce qui n'est pas le cas. Mais, l'augmentation de la quantité de PG formée en 10 mn pourrait s'expliquer par une dégradation accrue de ce phospholipide. Ce turnover accru du PG se ferait par d'autres voies que celle(s) conduisant à la formation du DPG, car la concentration de celui-ci reste peu importante quelque soit la méthode de marquage au ^{32}P utilisée. Ces voies métaboliques peuvent être multiples et jouer un rôle physiologique très différent. Le PG est connu comme étant le phospholipide qui a le turnover le plus important.

CONCLUSIONS

Devenir des phospholipides

- La quantité de ^{32}P des phospholipides préexistants dans les bactéries n'est pas affectée d'une façon importante lors de l'action des colicines A, E1, E2, H, K et Q.

- Les colicines A, E1, E3, H, K et Q provoquent des modifications qualitatives des phospholipides préexistants dans les bactéries : les taux de LPE et de DPG sont augmentés.

. L'augmentation des taux de LPE et de DPG est fonction de la durée de l'action, de la dose et de la nature de la colicine.

. Une partie de la LPE formée lors de l'action de ces colicines passe dans le milieu de culture.

- La colicine E2 ne provoque aucune modification qualitative des phospholipides préexistants dans les bactéries.

Synthèse des phospholipides

- 80% des synthèses des phospholipides sont arrêtées dès le début de l'action des colicines E1 et K. Parmi les lipides synthétisés, la LPE et le DPG sont en proportion plus élevée que dans les bactéries sans colicine.

- Les synthèses des phospholipides suivies par une incorporation continue de ^{32}P sont, lors de l'action de la colicine E2, semblables à celles des bactéries témoins pendant une durée au moins égale à une génération bactérienne.

. Les synthèses de phospholipides mesurées grâce à un marquage au ^{32}P de 10 mn. pendant l'action de la colicine E2, sont égales à celles des bactéries-témoins. Elles restent importantes même 2 h. après le début de l'action de la colicine E2. La proportion de PG formée pendant les synthèses s'accroît avec la durée de l'action de la colicine E2, alors que la proportion de PE synthétisée diminue.

Transformation des phospholipides dûes aux conditions de l'incubation .

- La mise en suspension de 10^9 bactéries par ml dans un milieu salin ou nutritif contenant 20% de saccharose provoque des modifications **dans** les proportions des phospholipides préexistants dans les bactéries : le taux de DPG est considérablement augmenté ; le taux de LPE est supérieur au taux normal.

Phospholipides des sphéroplastés incubées ou non en présence de colicine.

- La transformation des bactéries en sphéroplastés provoque une augmentation du taux de LPE parmi les phospholipides préexistants dans les bactéries.

- La colicine K provoque une légère augmentation du taux de LPE des sphéroplastés.

- Les synthèses de phospholipides par les sphéroplastés sont peu importantes.

. Elles sont encore réduites lors de l'action de la colicine K, mais non lors de l'action de la colicine E2.

CHAPITRE IV

OBSERVATIONS SUR DES METABOLITES PHOSPHORES

ENTRAINES AVEC LES PHOSPHOLIPIDES

LORS DE L'EXTRACTION PAR

LE METHANOL-CHLOROFORME

Des métabolites phosphorés sont entraînés avec les phospholipides lors de l'extraction de ceux-ci par le méthanol et le mélange méthanol- chloroforme 2-1 (vol/vol). La radioactivité totale des extraits lipidiques est supérieure à la radioactivité de l'ensemble des phospholipides. Un lavage à l'eau de l'extrait lipidique selon la technique décrite au chap. I permet de séparer facilement des phospholipides les métabolites phosphorés contaminants (MPC) : ils passent alors dans la phase aqueuse. Nous nous sommes intéressé à ces métabolites en constatant que leur radioactivité était plus importante dans les extraits obtenus à partir des bactéries traitées par la colicine E2 que dans ceux obtenus à partir des bactéries non traitées (autoradiogramme 3).

Nous étudierons l'évolution de la radioactivité de la phase aqueuse de l'extrait lipidique de bactéries *E. coli* K12 3000 , traitées ou non traitées avec la colicine E2 en fonction de la durée de l'incorporation de ^{32}P par les bactéries . Nous décrirons ensuite les essais de caractérisation et de purification des métabolites phosphorés contenus dans cette phase aqueuse.

I- Radioactivité des métabolites phosphorés extraits avec les phospholipides bactériens en fonction de la technique de marquage au ^{32}P des bactéries.

Les techniques de marquage au ^{32}P des bactéries sont les mêmes que celles utilisées lors de l'étude des phospholipides (chap. III).

AUTORADIOGRAMME III

Chromatographie en phase neutre sur couche mince d'acide silicique des phospholipides de bactéries E. coli K12 3000 incubées en présence de colicine E2. Le ^{32}P est ajouté à la culture à des temps différents de l'incubation pendant une durée de 10 minutes (temps portés au bas de la figure).

Témoin

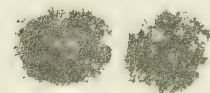
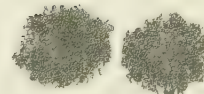
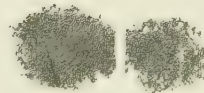
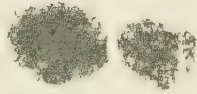
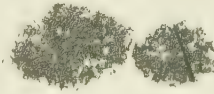
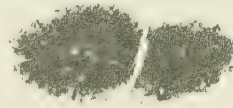
100 mg

DPG

PG

PG

Dépôts



0 mn

0 mn

15 mn

30 mn

1 h

2 h

3 h

4 h

5 h

La colicine E2 est ajoutée aux bactéries à une multiplicité de 60 U. L par bactérie. La culture bactérienne est laissée 20 mn à 20° C après l'addition de colicine E2 avant d'être mise à incuber à 37° C au temps zéro de l'expérience. Il en est de même pour la culture bactérienne non traitée par la colicine E2.

1) Bactéries cultivées en présence de ^{32}P pendant une durée correspondant à huit générations bactériennes et laissées en présence de ^{32}P .

Les bactéries cultivées pendant huit générations en présence de ^{32}P sont laissées en présence de ^{32}P pendant et après l'addition de la colicine E2.

Sur la figure 22 est représentée l'augmentation en fonction du temps de la quantité de ^{32}P trouvée dans la phase aqueuse après lavage des phospholipides bactériens. Cette quantité de ^{32}P représente, à tous moments, 15 à 20% de la quantité de ^{32}P de l'extrait lipidique avant lavage, pour les bactéries traitées ou non traitées avec la colicine E2.

2) Incubation en absence de ^{32}P des bactéries cultivées en présence de ^{32}P pendant huit générations.

La radioactivité de la phase aqueuse obtenue après lavage des phospholipides bactériens diminue très faiblement en fonction de la durée de l'incubation à 37° C (fig. 23). Cette radioactivité ne représente que 4 à 8% de la radioactivité de l'extrait lipide avant lavage. Ce faible pourcentage laisse supposer qu'une partie des métabolites phosphorés contaminants les phospholipides bactériens se sont transformés ou se sont associés avec d'autres constituants bactériens lorsque les bactéries sont restées 20 mn à 20° C avant l'incubation à 37 ° C.

3) Addition de ^{32}P à des bactéries non radioactives.

Le ^{32}P est ajouté aux bactéries au moment où celles-ci sont incubées au bain-marie à 37 ° C, ce moment étant considéré comme le temps zéro de l'expérience.

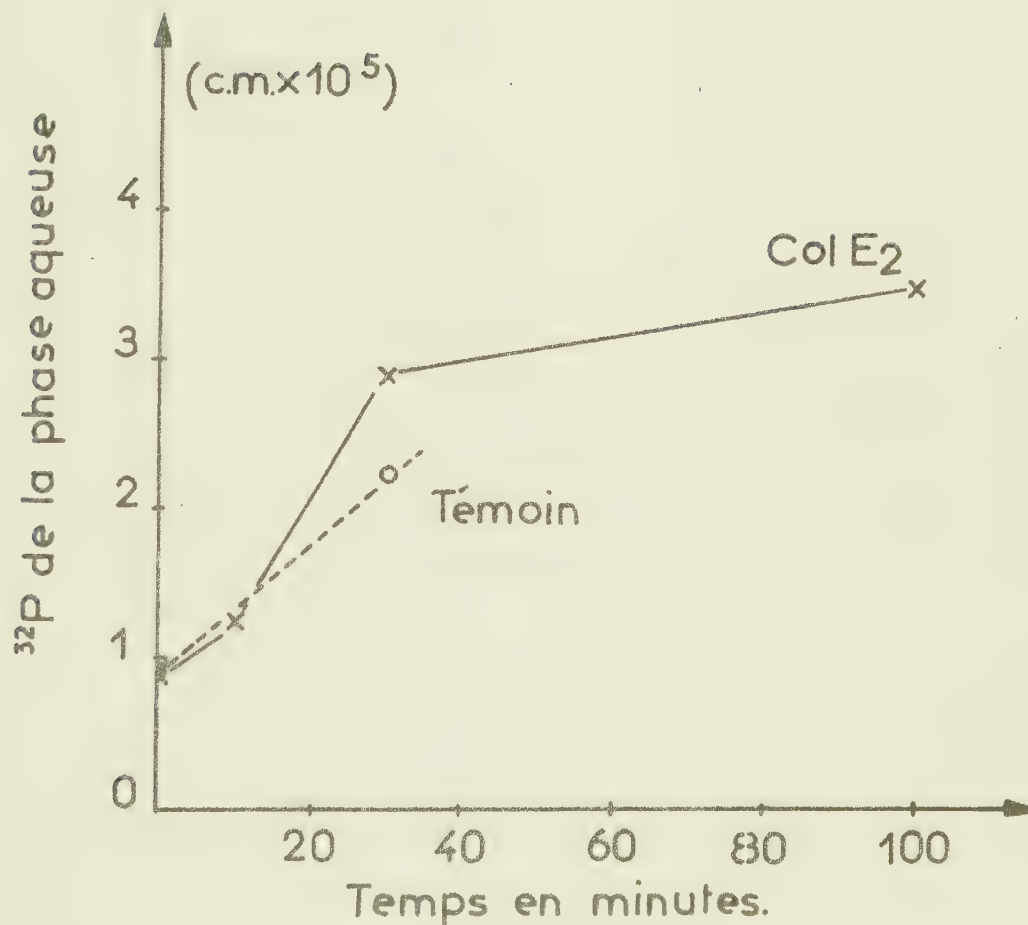


Fig.22. Radioactivité de la phase aqueuse de l'extrait lipidique des bactéries E.coli K₁₂ 3000.

Les bactéries préalablement marquées au ³²P sont laissées en présence de ³²P pendant l'incubation.

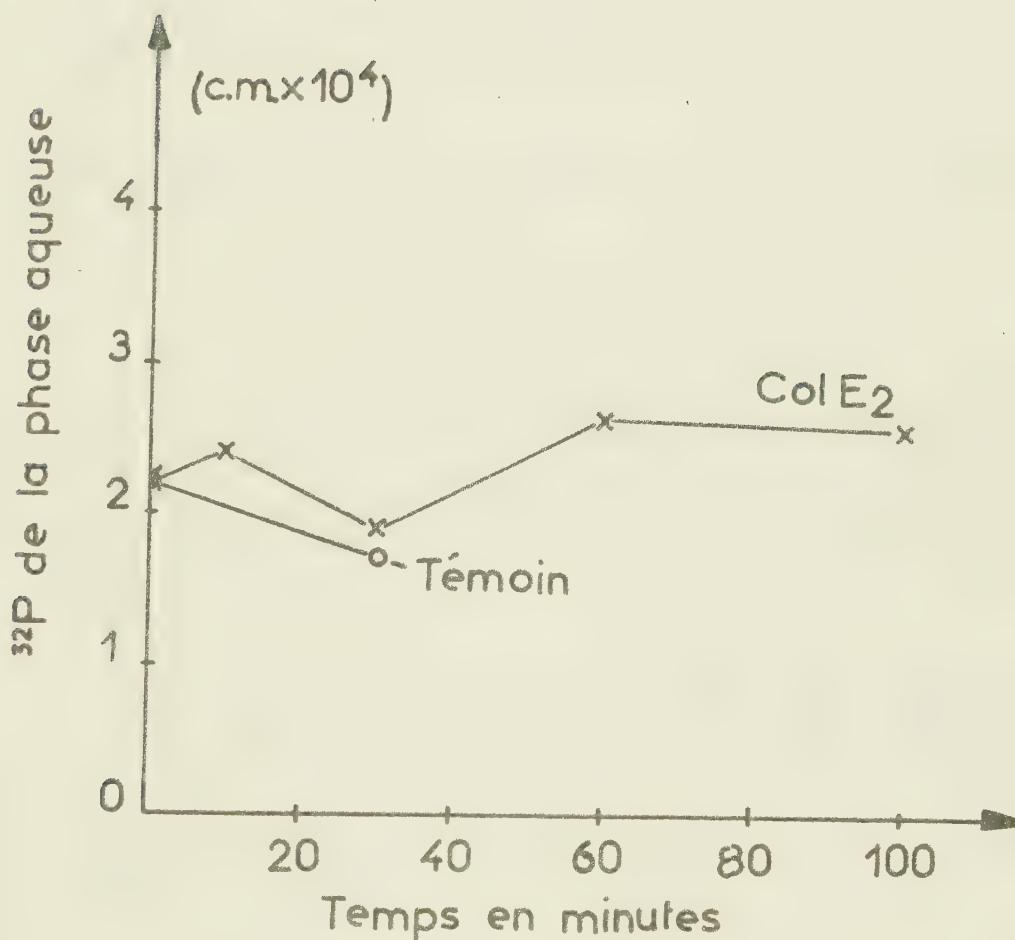


Fig.23. Radioactivité de la phase aqueuse de l'extract lipidique de bactéries E.coli K₁₂ 3000.

Les bactéries préalablement marquées au ³²P sont incubées en présence de phosphate froid.

La radioactivité de la phase aqueuse de l'extrait lipidique est importante dès les 10 premières minutes de l'incorporation (fig. 24), pour les bactéries témoins et pour les bactéries traitées par la colicine E2; elle est négligeable pour les bactéries traitées par la colicine K. Elle représente environ 20% de la radioactivité de l'extrait lipidique des bactéries témoins et 30 à 50% pour les bactéries traitées par la colicine E2.

4) Addition de ^{32}P pendant 10 mn à des bactéries non radioactives

Le ^{32}P est ajouté à des moments différents de l'incubation à 37° C pendant une durée de 10 mn.

L'incorporation de ^{32}P dans les métabolites phosphorés contaminants les phospholipides est importante (fig. 25). Elle augmente en fonction de la durée de l'action de la colicine E2 atteignant un maximum vers la 100ème mn. La radioactivité de ces métabolites représente 25% de la radioactivité de l'extrait lipidique avant lavage. Elle augmente avec la durée de l'action de la colicine et peut atteindre 60% de celle-ci entre la 140ème et la 150ème mn d'action de la colicine E2.

II - Essais de caractérisation et de purification des métabolites phosphorés entraînés lors de l'extraction des lipides bactériens.

Ces métabolites sont obtenus par lavage de l'extrait lipidique. La phase aqueuse dans laquelle ils sont isolés est un mélange eau-méthanol-chloroforme 48-47-1 (vol/vol.) Ils sont conservés dans ce mélange.

Ils sont accompagnés de produits non phosphorés colorables à la ninhydrine ou fluorescents aux U.V. Lors des essais de caractérisation, électrophorèses et chromatographies, les métabolites phosphorés sont repérés par autoradiographie. Ils ne sont ni fluorescents aux U.V. ni colorables à la ninhydrine ou à l'anthrone.

- Electrophorèse

Les métabolites phosphorés étudiés migrent vers l'anode en

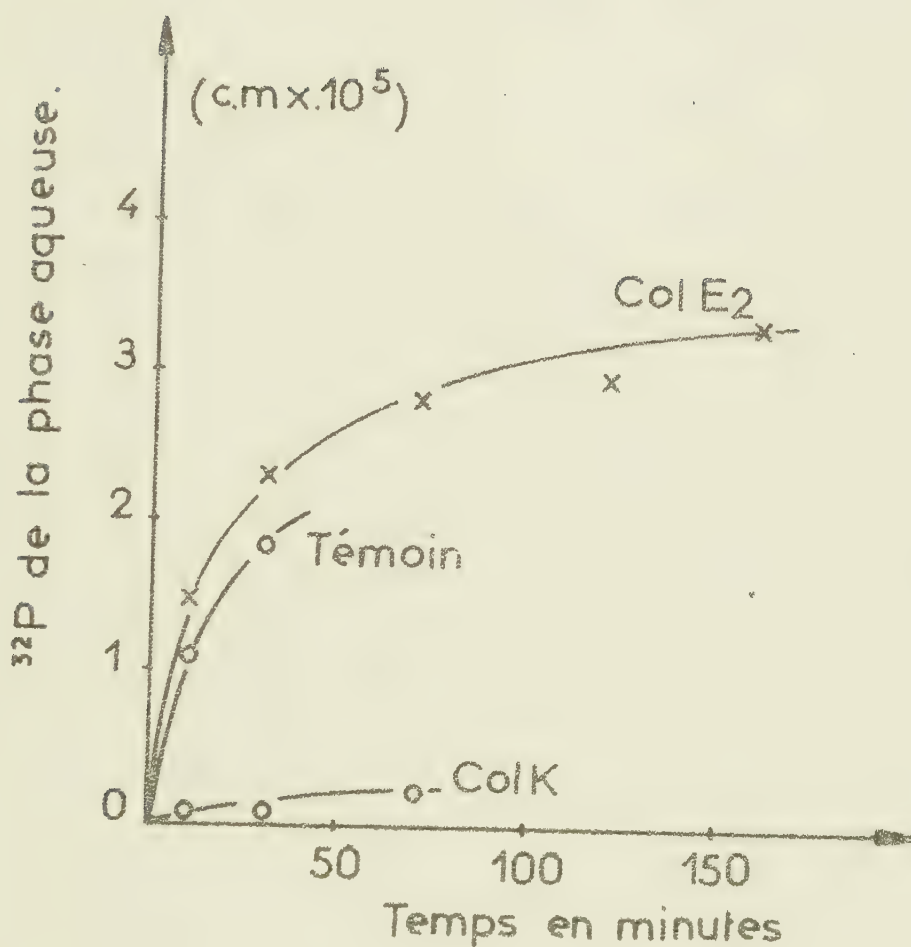


Fig.24. Incorporation de ^{32}P dans la phase aqueuse de l'extrait lipidique de bactéries *E. coli* K₁₂ 3000.

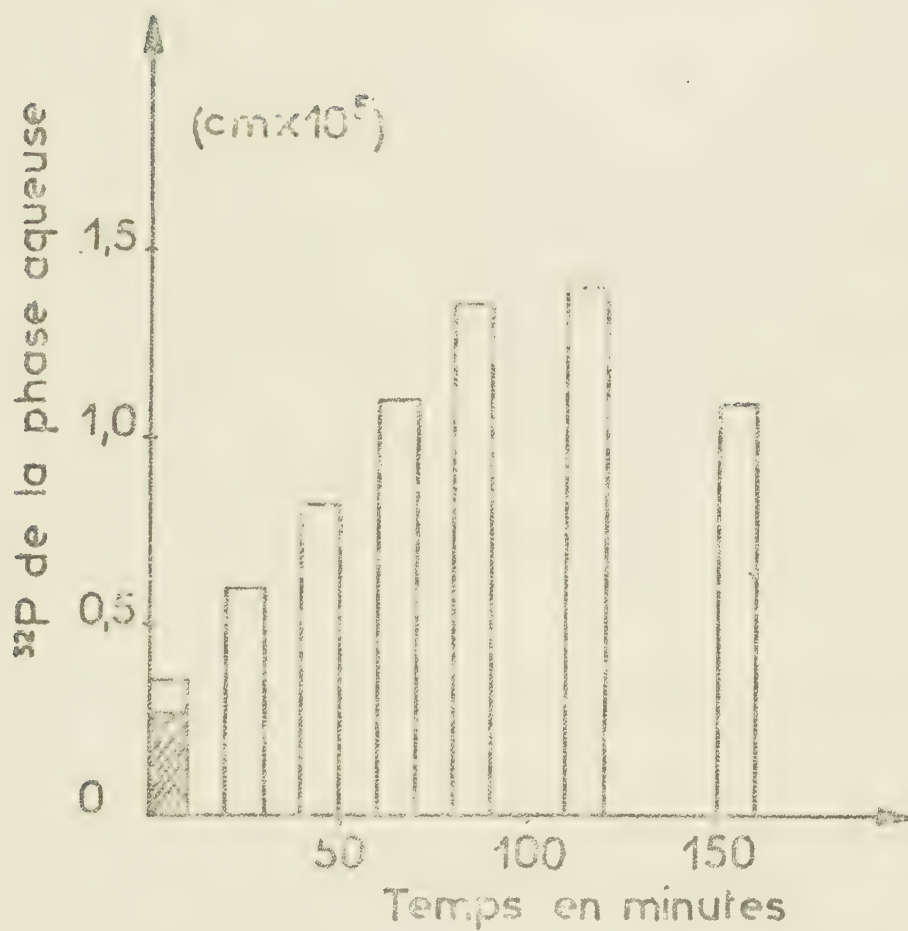


Fig.25. Incorporation en 10 mn. de ^{32}P dans la phase aqueuse de l'ex. trait lipidique d'E coli K12 3000 traité par la colicine E2.

En hachuré, incorporation par E.coli non-traité.

électrophorèse sur papier en tampon véronal O, OIM pH 8,6 à 280 volts pendant 3 h. Huit métabolites différents ont pu ainsi être dénombrés parmi lesquels une faible quantité de phosphates et pyrophosphates.

- Chromatographie

Les meilleures séparations des métabolites phosphorés ont été obtenues par chromatographie ascendante sur papier Wathman N° 1 en phénol saturé d'eau ou en propanol-ammoniaque-eau 6-3-1 (vol/vol). Les Rf de 10 produits ont pu être mesurés. La GPE (glycérylphosphoryléthanolamine), le GPGPG (glycérylphosphorylglycérylphosphorylglycérol), le GP (glycérophosphate) et la phosphoryléthanolamine ont pu être ainsi identifiés.

Par chromatographie bidimensionnelle sur une couche mince de cellulose en

- 1) Propanol-ammoniaque-eau 6-3-1 (vol/vol)
- 2) phénol saturé d'eau, nous avons pu dénombrer jusqu'à 16 métabolites phosphorés.

Le grand nombre de produits à isoler et à identifier nous a fait hésiter à poursuivre plus loin l'analyse chimique.

Par chromatographie sur colonne de Sephadex N° 10, 15, 25 fine et 25 superfine dans un mélange eau-méthanol 3-1 (vol/vol), nous avons pu connaître l'ordre de grandeur du poids moléculaire de ces métabolites. Il est inférieur à 1000. (Il faut noter que ces métabolites ont tendance à former des agrégats en présence de méthanol qui ne sont pas retenus dans les colonnes de Sephadex.)

DISCUSSION

La méthode d'obtention de ces produits ne permet pas de les caractériser : sont-ils ou non associés aux phospholipides, ne se trouvent-ils qu'au niveau de la membrane, ou sont-ils une fraction de métabolites phosphorés répandus dans toute la cellule ? Leur quantité peut varier d'une extraction à l'autre et leur proportion par rapport aux phospholipides n'est pas constante.

Leur nature ne semble pas lipidique : ils ne sont pas solubles dans le chloroforme, ils ne migrent pas lors des chromatographies des lipides.

Ces métabolites sont peut-être semblables aux produits phosphorés non nucléotidiques et non lipidiques dont NOMURA et MAEDA (1965), LEVISOHN, KONISCKY et NOMURA (1968) ont vu la synthèse continuer lors de l'action de la colicine K et augmenter lors de l'action de la colicine Ib. Cette fraction phosphorée étudiée par NOMURA peut contenir des métabolites intermédiaires de la glycolyse dont la synthèse est maintenue ou accrue lors de l'action des colicines E1 et K (Fields et Luria, 1969). Les extraits obtenus à partir de bactéries traitées avec la colicine K ne contiennent que très peu de métabolites phosphorés contaminants : ils peuvent avoir été libérés dans le milieu de culture.

Le fait que ces métabolites soient en quantité importante chez les bactéries traitées par la colicine E2 nous avait fait émettre l'hypothèse d'une relation métabolique entre eux et les phospholipides. Ces métabolites seraient des précurseurs ou des produits de dégradation des phospholipides. Les précurseurs phosphorés non lipidiques des phospholipides sont les acylcoenzyme A ou le co-enzyme A. Mais nous n'avons pu les identifier par chromatographie. Nous avons , par contre , isolé quelques produits de dégradation des phospholipides : GP, GPE, phosphophoryl éthanolamine et GPGPG.

Ces métabolites pourraient être des transporteurs servant aux processus de perméation. Certains auteurs (GALE et FOLKES , 1967) ont montré le rôle du glycérol et du PG dans le transport des acides aminés. Ces métabolites semblent être liés aux activités de la membrane et certains pourraient être des nucléotides. CASHEL et GALLANT (1969) ont isolé des souches " stringent " 19 métabolites phosphorylés qui se séparent d'une façon analogue aux nôtres : parmi eux se trouverait le guanosine tétraphosphate.

Il semble que ces métabolites aient un rôle à jouer dans le fonctionnement de la membrane du fait de leur solubilité dans les phases aqueuses et de leur affinité pour les phases lipidiques

CONCLUSIONS

- Lors de l'extraction des lipides bactériens par le méthanol-chloroforme, des métabolites phosphorés hydrosolubles sont entraînés. Ils peuvent être isolés par lavage à l'eau de l'extrait lipidique.

- L'évolution de la quantité de ^{32}P de ces métabolites phosphorés selon différentes méthodes de marquage des bactéries est décrite. Une fraction de ces métabolites aurait un turnover rapide.

- Par chromatographie bidimensionnelle, 16 métabolites différents ont pu être dénombrés. Parmi eux, certains produits de dégradation des phospholipides.

- Leur poids moléculaire estimé par chromatographie sur colonne de Sephadex est inférieur à 1000.

CHAPITRE V

ETUDE DES PHOSPHOLIPIDES DE E. COLI APRES TRAITEMENTS DES BACTERIES PAR DIFFERENTS AGENTS

Plusieurs agents chimiques ou physiques sont connus pour agir sur la membrane bactérienne. Il était intéressant de savoir s'ils entraîneraient des modifications des phospholipides bactériens et si ces modifications étaient différentes de celles provoquées par les colicines. Ainsi des bactéries marquées au ^{32}P ont-elles été traitées par différentes agents dans des conditions semblables à celles où elles se trouvaient lors du traitement par les colicines. Nous avons fait agir des agents chimiques tels que des antibiotiques : pénicilline et chloromycétine, un complexant : l'EDTA, un antiseptique : le formol, un agent découplant les oxydations phosphorylantes : le 2-4-dinitrophénol (DNP), des solvants organiques : le toluène et le chloroforme, et enfin, un milieu de culture dépourvu de source d'énergie ; les agents physiques étudiés sont la chaleur : effet de températures supérieures à 37°C , et la pression osmotique : pression osmotique élevée obtenue à l'aide de saccharose 0,25 M ou choc osmotique obtenu par suspension dans une solution tampon de bactéries qui se trouvaient au préalable en présence de saccharose 0,25 M.

I - -AGENTS CHIMIQUES .

Les techniques utilisées sont celles décrites dans le chapitre III. Les résultats obtenus lors de l'étude des phospholipides préexistants dans les bactéries d'E. coli K12 1000 sont portés dans le tableau XIX.

a) Chloromycétine et pénicilline.

La chloromycétine (CM) à 100ug/ml et la pénicilline à 1000 ui/ml provoquent toutes des deux, en 1 h., une augmentation du taux de DPG et du taux de LPE radioactifs de bactéries marquées au ^{32}P et incubées en présence de phosphore non radioactif. L'augmentation de DPG provoquée par la chloromycétine est comparable à

TABLEAU XIX

Devenir des phospholipides (x) des bactéries E. coli K12 soumises à l'action des différents facteurs.

Traitements	Durée d'action mn.	Pourcentage de ^{32}P			
		PE	LPE	PG	DPG
Témoin	0	75	1	11	10
	30	78	1	9	9
	60	80	1,5	5,5	9
Chloromycétine 100 ug/ml	60	66	8	5	18
Pénicilline (1000 u/ml)	60	56	19	4	18
EDTA $3 \cdot 10^{-2}$ M	30	79	1	6	11
10^{-2} M	60	78	1	6	12
Formol 0,06%	60	65	7	7	18
D N P 10^{-3} M	30	73	1	5	18
Saccharose 0,25 M	30	77	1	9	10
Toluène 0,5%	30	69	4	12	12
	60	61	8	11	17
Chloroforme 0,5%	30	62	7	10	18
	60	63	5	9	20
Milieu salin sans source de carbone	30	73	0,5	6,5	17
	60	72,5	1,5	5	18
	120	72	1,5	4,5	19
Chauffage 48°C	15	77	2	5	13
	30	79,5	1,5	6	10
	60	81	2	6	8
Chauffage 55°C	15	60	18	6	13
	30	58	19	5	14
	60	48	27	6	16
Chauffage 61°C	15	63	13	5	16
Chauffage 80°C	15	63	12	6	16

(x) La radioactivité des phospholipides non étudiés représente environ 3% de la radioactivité totale.

celle provoquée par la pénicilline. Le taux de LPE radioactive trouvée dans les bactéries après 1 h. de traitement par la pénicilline est très supérieur (19% de la radioactivité des phospholipides totaux) à celui trouvé avec la chloromycétine (8%). Cette augmentation si importante du taux de LPE coïncide avec la lyse des bactéries : sous l'action de la pénicilline, le sac muréique ou paroi cellulaire ne peut plus être synthétisé, les bactéries en croissance sont transformées en sphéroplast et éclatent par turgescence. La formation de LPE peut être une cause ou une conséquence de la lyse bactérienne.

La pénicilline à la concentration utilisée n'arrête les synthèses des phospholipides que progressivement. Dans les 10 premières minutes de son action, les synthèses représentent 80% de celle des bactéries non traitées (alors que 10 mn après l'action de la colicine K elles ne représentent plus que 15% de celles des bactéries-témoins) ; 40 mn plus tard, elles ne sont plus que de 10%.

b) L'EDTA (Ethylène-diamine-tétraacétate)

Le devenir des phospholipides bactériens n'est pas transformé par l'addition d'EDTA. Toutefois, si l'EDTA est ajouté à une concentration 10^{-2} M en même temps que de la colicine K, .

TABLEAU XX

Effet de divers traitements sur l'incorporation, en 30mn, de ^{32}P dans les phospholipides de E. coli K12.

Traitement	^{32}P dans les phospho- lipides (c. m.)	^{32}P dans la phase aqueuse de l'ex- trait li- pidique (c. m.)	Pourcentage de ^{32}P			
			PE	LPE	PG	DPG
Témoin	46 10^4	21 10^4	70	1	21	8
EDTA 10^{-2}M	34 "	17 "	68	1	23	8
DNP 10^{-3}M	3 "	7 "	28	1	62	9
Formol 0,06%	1 "	3 "	57	7	27	9
Eau physiologique	16 "	40 "	50	6	32	12
Saccharose 8%	31 "	13 "	68	1	21	10
Col E2(100U. L. /bie)	41 "	36 "	72	1	21	6
Col E2 + EDTA	36 "	22 "	73,5	1,5	20	5

60 U. L par bactérie, on ne constate pas d'augmentation du taux de LPE comme lors de l'action de la colicine K seule; l'augmentation du taux de DPG est, par contre, égale à celle provoquée par la colicine K.

L'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides est moins importante sous l'action de l'EDTA que dans les bactéries-témoins (tableau XX). Il en est de même pour la synthèse des métabolites phosphorés trouvés dans la phase aqueuse de l'extrait lipidique. La synthèse de ces composés qui est accrue sous l'action de la colicine E2 reste la même que dans les bactéries témoins lors de l'addition simultanée de EDTA et de colicine E2. L'EDTA semble protéger les bactéries de l'action des colicines.

c) Le 2,4 dinitrophénol ou DNP

Le DNP, 10^{-3}M , ajouté à des bactéries marquées au ^{32}P et incubées en présence de phosphore non radioactif, provoque, en 30 mn, une forte augmentation du taux de DPG radioactif, comparable à l'augmentation provoquée par la colicine K, mais non accompagnée d'une augmentation du taux de LPE radioactive. Ajouté à des bactéries en même temps que la colicine K (60 U. L. / bactérie), il n'empêche pas l'élévation du taux de LPE par cette dernière.

La synthèse des phospholipides est très fortement diminuée sous l'action du DNP. L'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides n'est que 8% de celle qui a lieu dans les bactéries-témoins (tableau XX). Par contre, la radioactivité des métabolites phosphorés contenus dans la phase aqueuse de l'extrait lipidique représente 35% de celle des mêmes métabolites des bactéries-témoins. Le pourcentage de ^{32}P dans chaque phospholipide synthétisé est modifié lors de l'action du DNP. La synthèse du PG est fortement accrue : le pourcentage de ^{32}P du PG par rapport au ^{32}P de la totalité des phospholipides atteint 60% en 30 mn au lieu de 20% pour les bactéries-témoins. Le PG étant le principal précurseur du DPG, il est assez étonnant de constater qu'il n'y a pas une synthèse importante de DPG.

d) Le formol

Le formol ajouté aux bactéries à une concentration de 0,06% provoque les mêmes transformations des phospholipides bactériens que la colicine K : augmentation des taux de LPE et de DPG.

Mais il arrête l'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides beaucoup plus fortement que la colicine K : en 30 mn, la radio-activité des phospholipides ne représente que 2% de celle des phospholipides des bactéries-témoins (tableau XX), alors que la radioactivité des produits phosphorés de la phase aqueuse de l'extrait lipidique représente 14% de celle obtenue à partir des bactéries-témoins. Parmi les phospholipides synthétisés en 30 mn, la proportion de LPE est 6 fois supérieure à celle des bactéries - témoins et 2 fois supérieure à celle des bactéries traitées par la colicine K; la proportion de DPG est aussi légèrement supérieure à celle des bactéries-témoins.

e) Le toluène et le chloroforme.

Le toluène et le chloroforme ont été employés à une concentration de 0,5%. Ces deux solvants organiques provoquent une augmentation des taux de DPG et de LPE comparables à celle obtenue avec la colicine K (tableau XIX).

f) Milieu salin sans source d'énergie.

Les bactéries marquées au ^{32}P ont été , après lavages , mises en suspension dans un milieu salin sans source d'énergie contenant : Na_2HPO_4 25,1 g; KH_2PO_4 4,08 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 g. Après 30 mn d'incubation à 37°C , le taux de DPG radioactif se trouve augmenté comme sous l'action de la colicine K; le taux de LPE radioactive n'augmente pas d'une façon significative.

L'effet d'un milieu salin sans source d'énergie sur l'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides a été étudiée à partir de bactéries mises en suspension dans de l'eau physiologique. En 30 minutes , elle atteint 33% de celle des bactéries cultivées en tryptose 5% (tableau XX), alors que la radioactivité des produits phosphorés contenus dans la phase aqueuse de l'extrait lipidique est 2 fois supérieure à celle des bactéries-témoins. Parmi les phospholipides synthétisés , le PG , le DPG , et surtout la LPE sont en proportion supérieure à la normale.

II)- LES AGENTS PHYSIQUES

Les bactéries ont été soumises à différentes températures et à différentes pressions osmotiques.

a) Chauffage

Un chauffage des bactéries pendant 15 à 60 mn à une température supérieure ou égale à 48 ° C provoque des transformations des phospholipides préexistants dans les bactéries : il y a une augmentation du taux de DPG comparable à celle produite par la colicine K et une augmentation du taux de LPE très supérieure à celle que provoque la colicine . En maintenant les bactéries à 55 ° C, le taux de LPE radioactive atteint 18% en 15 mn et 27% en 60 mn. Comme l'ont montré RAMPINI, LUX, CAVARD, et BARBU (1969), cette augmentation du taux de LPE par la chaleur est très rapide : elle se produit en 5 mn. En effet , après chauffage pendant 5 mn à diverses températures de bactéries marquées au ^{32}P , lavées et suspendues dans une solution saline (Tris 0,02 pH 7,5, NaCl 0,14M), on observe que , au dessus de 48° C , le pourcentage du ^{32}P trouvé dans la LPE augmente considérablement tandis que celui trouvé dans la PE diminue de façon correspondante . Cette augmentation passe par un maximum situé à 60 ° C ce qui signifie que la phospholipase responsable de la transformation de la PE en LPE est peu active à des températures supérieures à 60 ° C. D'ailleurs la LPE trouvée dans les bactéries après chauffage au-dessus de 60 ° C pourrait être formée avant que l'équilibre thermique soit atteint. Par contre , le taux de DPG n'augmente plus avec la température au-dessus de 55 ° C.

b) Pression osmotique

Les proportions des phospholipides bactériens ne sont pas modifiées par une pression osmotique élevée réalisée à l'aide de saccharose 0,25 M. Toutefois l'addition simultanée de saccharose 0,25 M et de la colicine K provoque un accroissement considérable du taux de DPG qui peut atteindre 34% en 30 mn au lieu de 18% sous l'action de la colicine K seule.

L'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides se trouve légèrement ralentie dans ces conditions de pression osmotique élevée : elle représente 70% de celle des bactéries témoins, mais la proportion des différents phospholipides est inchangée (tableau XX).

Le choc osmotique obtenu par la mise en suspension des bactéries dans du tampon Tris 0,01 M après centrifugation d'une culture en milieu tryptose contenant 20% de saccharose ne provoque pas de modifications parmi les phospholipides bactériens préexistants. Si des sphéroplastes d'E. coli sont soumis à ce choc osmotique, il y a alors augmentation du taux de LPE (ce taux passe de 8 à 14%) ; cette augmentation accompagne la lyse due à l'éclatement des sphéroplastes lors du choc osmotique.

DISCUSSION

Le métabolisme des phospholipides d'E. coli est modifié par la plupart des facteurs que nous avons étudiés. L'EDTA et les différences de pression osmotique sont les seuls facteurs qui n'affectent pas ce métabolisme. Les modifications provoquées sont en général des augmentations des taux de DPG et de LPE parmi les phospholipides préexistants dans les bactéries. Les augmentations de DPG et de LPE consécutives à l'action de la chloromycétine, du formol et des solvants organiques sont semblables à celles que l'on constate en présence de colicine ou même à celles produites par le complément (BARBU et LUX, 1969). On doit admettre que ces facteurs agissent sur la structure et sur l'équilibre physiologique de la membrane de telle façon que l'action des phospholipases soit stimulée. Il en serait de même pour la colicine. Mais d'autres hypothèses pourraient être envisagées : ces agents pourraient activer (ou démasquer) une phospholipase ou bien inhiber une lysophospholipase ou une acylase qui transforme la LPE formée en PE. Or nous avons mis en évidence avec RAMPINI, LUX et BARBU (1969) qu'il y a bien, lors du chauffage des bactéries, activation de phospholipases transformant la PE en LPE. Les arguments que nous avons sont les suivants :

1. La quantité de LPE que la phospholipase forme à certaines températures en 5 mn est trop importante pour que l'on puisse imaginer que la cellule la forme physiologiquement et la transforme par la réaction inverse.

2. L'activation de la phospholipase se fait brusquement entre 40 ° C et 50 ° C ce qui est une transition trop rapide pour l'inactivation de l'enzyme responsable de la réaction $\text{LPE} \rightarrow \text{PE}$.

3. L'absence de source d'énergie pendant 60 mn ne provoque pas une accumulation de LPE comme on pourrait s'y attendre si ce phospholipide était physiologiquement formé en grande quantité à partir de la PE et était ensuite acylé.

4. Des solvants organiques à froid peuvent également activer la phospholipase.

Il doit en être de même pour les autres agents qui provoquent une augmentation du taux de LPE et en particulier pour la colicine. Le problème reste de savoir comment la PE de la membrane cellulaire est protégée de l'action de la phospholipase et comment la colicine supprime cette protection.

La LPE ayant des propriétés détergentes, il n'est pas étonnant que la lyse bactérienne se produise lorsque sa quantité devient très importante. C'est ce qui se passe après l'action de la pénicilline, ou lors de l'éclatement des sphéroplastes par choc osmotique. RAMPINI (1969) a observé le même phénomène lors de la lyse des bactéries après multiplication des phages. La LPE doit être une cause plutôt qu'une conséquence de la lyse. C'est le cas dans de moindres proportions, de la colicine et du complément : nous verrons (chap. VI) que les colicines provoquent une sortie importante du matériel cellulaire dans le milieu de culture, au moment où le taux de LPE atteint son maximum.

L'augmentation du taux de DPG accompagne l'augmentation du taux de LPE lors de l'action de la colicine et également lors de l'action du formol, de la chloromycétine et de solvants. Ces deux augmentations ne sont pas nécessairement liées puisque le DNP et le milieu salin sans source d'énergie provoquent seulement une augmentation du taux de DPG. Ces deux derniers facteurs provoquent l'arrêt de la synthèse de l'ATP de la cellule : cet arrêt pourrait être la cause ou plutôt la conséquence de l'augmentation du taux de DPG. Cette hypothèse pourrait également expliquer le DPG produit sous l'action de la chloromycétine, du formol, des solvants et de la colicine.

La colicine K peu provoquer une augmentation du taux de DPG sans augmentation du taux de LPE lorsqu'elle est ajoutée aux bactéries en présence d'EDTA. Les deux phénomènes sont donc distincts l'un de l'autre. L'action de l'EDTA comme inhibiteur des phospholipases peut s'expliquer par son rôle de complexant des ions divalents. De nombreux auteurs (VAN DEENEN , 1965 , DE HAAS , 1969 , PAYSANT et coll. 1969, OZAKI et coll. 1966) ont montré que les phospholipases nécessitent la présence d'ions divalents comme activateurs.

Le fait que nous puissions obtenir par d'autres agents des modifications du métabolisme des phospholipides comparables à celles obtenues avec les colicines suggère que ces modifications du métabolisme des phospholipides peuvent constituer une étape essentielle de l'effet létal de la colicine.

0
0 0

CONCLUSIONS

- La plupart des facteurs physiques et chimiques agissant sur la membrane bactérienne provoquent des transformations des phospholipides.

- Le métabolisme des phospholipides de E. coli K12 3000 n'est cependant pas modifié par l'action de l'EDTA ou par celle d'une pression osmotique élevée ou par celle d'une température de 48 ° C.

- Au contraire , la chloromycétine , la pénicilline , le formol, le toluène , le chloroforme , et le chauffage à 55° C, 61° C ou 80° C provoquent une augmentation des taux de LPE et de DPG des bactéries traitées.

- Cette augmentation n'est comparable à celle obtenue sous l'action des colicines que dans le cas du formol, de la chloromycétine, du toluène et du chloroforme. La pénicilline provoque surtout une

augmentation considérable du taux de LPE et cela après 60 mn. d'action, c'est-à-dire lorsque la lyse des bactéries survient. Cette augmentation très importante de LPE est également obtenue sous l'action de températures supérieures ou égales à 50° C, avec un maximum à 60° C.

- Le DNP et la privation de source d'énergie ont un effet sur les phospholipides préexistants dans les bactéries différent de celui des autres facteurs étudiés. Ces agents provoquent une élévation importante du taux de DPG non accompagnée d'une élévation du taux de LPE. Cette transformation est également obtenue lorsqu'on traite les bactéries simultanément avec de la colicine K et de l'EDTA 10^{-2} M.

CHAPITRE VI

MODIFICATIONS DE LA PERMEABILITE ET DE LA RESPIRATION DES BACTERIES SENSIBLES LORS DE L'ACTION DES COLICINES

La composition des phospholipides de la membrane bactérienne étant modifiée lors de l'action des colicines , les activités de la membrane peuvent en être perturbées.

HAMON (1964) a décrit une action lytique des colicines intervenant après quelques heures d'incubation. NOMURA et MAEDA (1965) et LURIA (1964) ont montré que les colicines E1 et K inhibent l'accumulation de plusieurs substrats dans les bactéries, contrairement à la colicine E2, mais permettent la libération de ceux-ci si la cellule en contient , comme c'est le cas par exemple pour le TMG (thiométhylgalactoside). L'inhibition de l'entrée de galactoside dans la bactérie serait due à l'arrêt des synthèses des macromolécules et en particulier des perméases , arrêt consécutif à l'action des colicines E1 et K (LURIA 1964). FIELS et LURIA (1969) observant la sortie de certains produits phosphorés du métabolisme glucidique , supposent que les colicines agissent indirectement sur les systèmes de transport en arrêtant le métabolisme énergétique; la diffusion ne serait pas gênée, mais les transports nécessitant de l'ATP arrêtés.

JACOB et coll (1952) ont montré que la colicine E1 arrête, dès le début de son action , l'accroissement de l'intensité respiratoire. NOMURA (1963) a remarqué que la colicine E2 n'affecte pas la respiration bien qu'elle inhibe les synthèses de ADN, d'ARN et des protéines.

Notre étude a porté sur la perméabilité et sur la respiration des bactéries *E. coli* K12 sous l'action des colicines E2 et K.

I - PERMEABILITE.

1) Densité optique des cultures bactériennes traitées par les colicines.

Des suspensions , en milieu tryptose 1% d'*E. coli* K12 ($2,5 \cdot 10^8$ bactéries/ml) sont mises en contact avec diverses quantités de colicine K pendant 10 mn à 20° C., pour permettre la fixation de celle-ci, puis elles sont incubées avec agitation à 37° C. La figure 26 montre les variations de la densité optique des suspensions en fonction du temps d'incubation. La densité optique commence à diminuer immédiatement après le début de l'incubation à 37° C; la diminution peut atteindre 65% de la valeur initiale lorsqu'il y a plusieurs U.L. de colicine par bactérie. Pour des quantités de colicine de l'ordre de l'unité létale , la diminution de la densité optique est compensée par l'augmentation due à la croissance des bactéries qui n'ont pas fixé de colicine. Pour obtenir cette diminution de densité optique , il est indispensable de maintenir les bactéries dans un milieu de culture complet, car , si on les met en suspension en milieu salin sans source d'énergie, la diminution de densité optique est très faible ; dans les trois premières heures, elle est égale à celle des témoins sans colicine.

A titre de comparaison, on a indiqué sur la figure 26 le comportement de bactéries mises en présence de pénicilline 1 000 unités/ml. La diminution de la densité optique ne commence qu'après une augmentation initiale : elle est alors plus brusque et atteint un seuil inférieur à celui obtenu avec des colicines.

La cinétique de la diminution de densité optique que nous observons est différente de celle qui est rapportée par JACOB et coll. (1952) et par FAGUET (1967 b). Les différences proviennent de nos conditions expérimentales qui comportent une fixation préalable de la colicine pendant 10 mn à 21° C (à cette température, les colicines n'entraînent pas de diminution de densité optique , pendant la durée des expériences). En effet, la fixation n'étant pas instan -

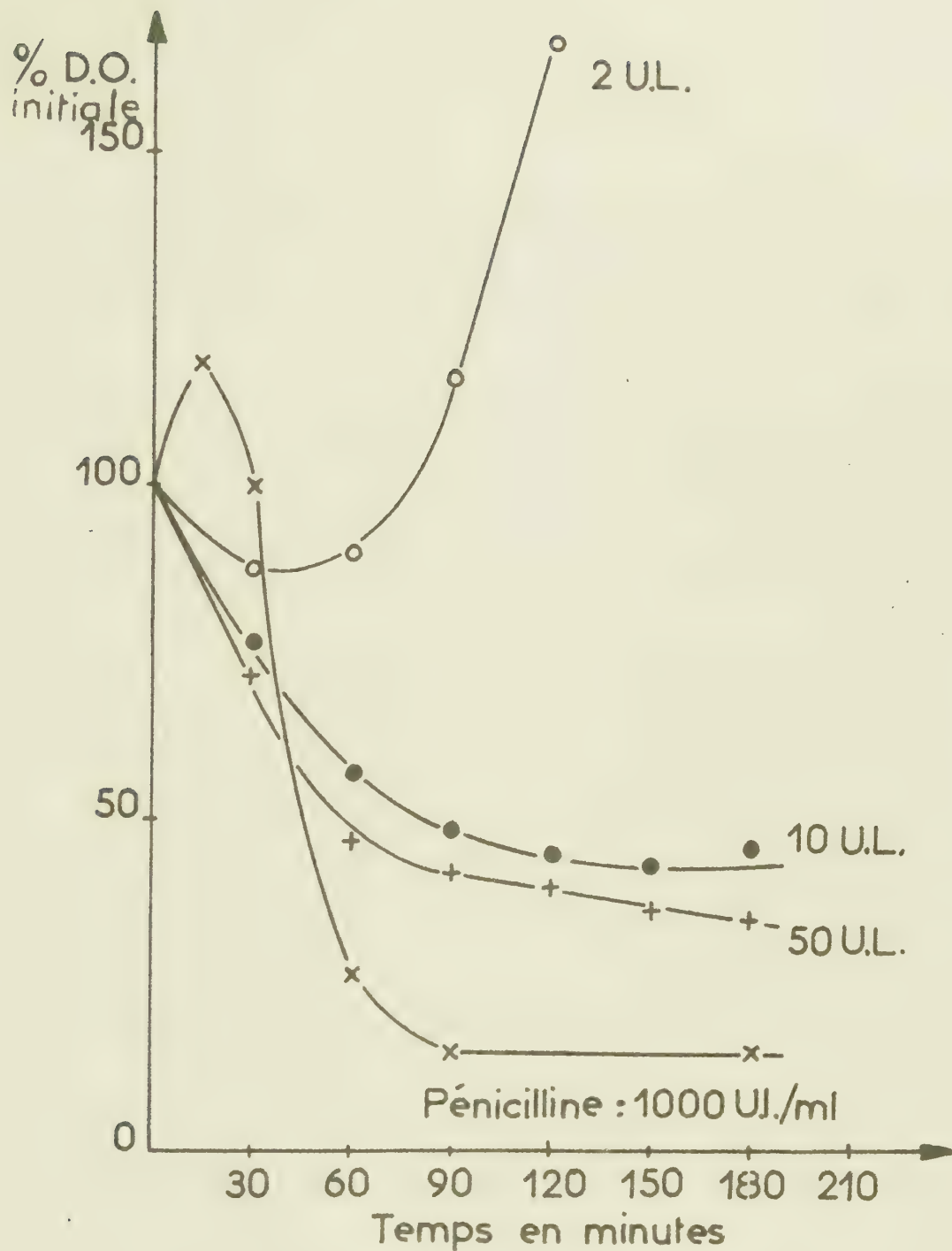


Fig.26. Variation de la densité optique des suspensions d'E coli K₁₂ en fonction de la quantité de colicine K ajoutée.

tanée, lorsque la colicine est ajoutée à des bactéries maintenues à 37°C, la diminution de densité optique des bactéries qui ont fixé de la colicine est compensée par l'augmentation de densité optique due à la croissance des bactéries qui n'en ont pas encore fixée.

Afin d'éliminer l'effet de cette croissance bactérienne sur la densité optique des suspensions, nous avons utilisé divers moyens pour obtenir une bactériostase. En présence d'un agent bactériostatique, la diminution de densité optique commence dès les premières minutes d'action de la colicine et est proportionnelle, dans certaines conditions, au nombre d'unités létales de colicine ajoutées aux bactéries. C'est cette proportionnalité qui nous a permis de mettre au point le dosage des colicines décrit dans le chapitre I.

La diminution de la densité optique des cultures bactériennes a été obtenue avec toutes les colicines que nous avons testées : B, E1, H, I, K), à l'exception de la colicine E2. Avec la colicine E2, l'effet contraire est obtenu : la densité optique augmente lentement pendant 60 mn pour se stabiliser à une valeur égale à 150% de la densité optique initiale (fig. 27). Mais, si la colicine E2 est ajoutée aux bactéries en présence de chloromycétine à une concentration de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la densité optique de la culture diminue. Cette diminution n'est pas due à la chloromycétine (fig. 6, chap. I), mais à l'action conjuguée de la chloromycétine et de la colicine E2.

2) Perte de constituants phosphorés par les bactéries sensibles incubées en présence de colicine.

Des suspensions de bactéries préalablement marquées au ^{32}P dans les conditions décrites au chapitre III, sont incubées avec agitation à 37°C en présence de diverses quantités de colicine K. Des échantillons sont prélevés à divers moments et filtrés sur millipore O, 45 μ .

La figure 28 montre l'augmentation de la radioactivité des filtrats en fonction du temps de contact bactéries-colicine. La vitesse de sortie du ^{32}P hors de la bactéries est fonction de la quantité de colicine. Par contre, (tableau XX) elle ne dépend pas du nombre des bactéries. A quantité de colicine constante, elle ne diminue pas pour des concentrations de plus en plus fortes en bactéries. Ceci est en accord avec une cinétique d'action des coli-

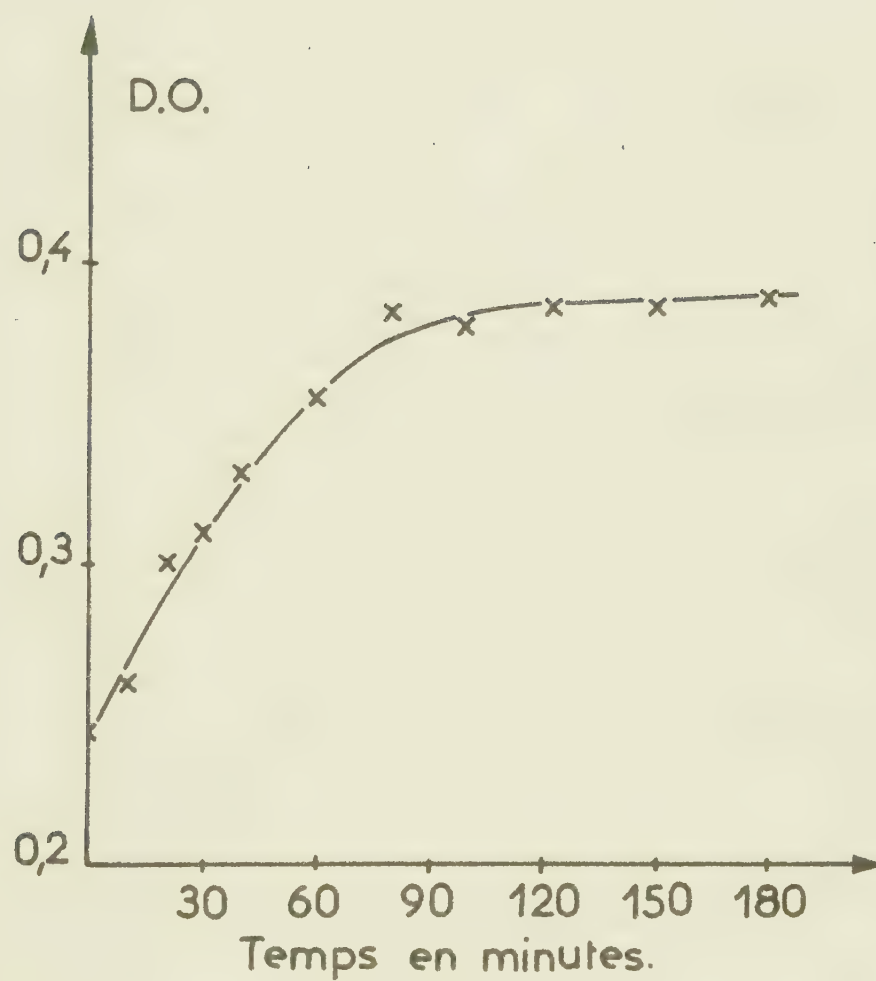


Fig.27. Densité optique d'une culture d'E.coli K₁₂3000 incubée en présence de colicine E₂.

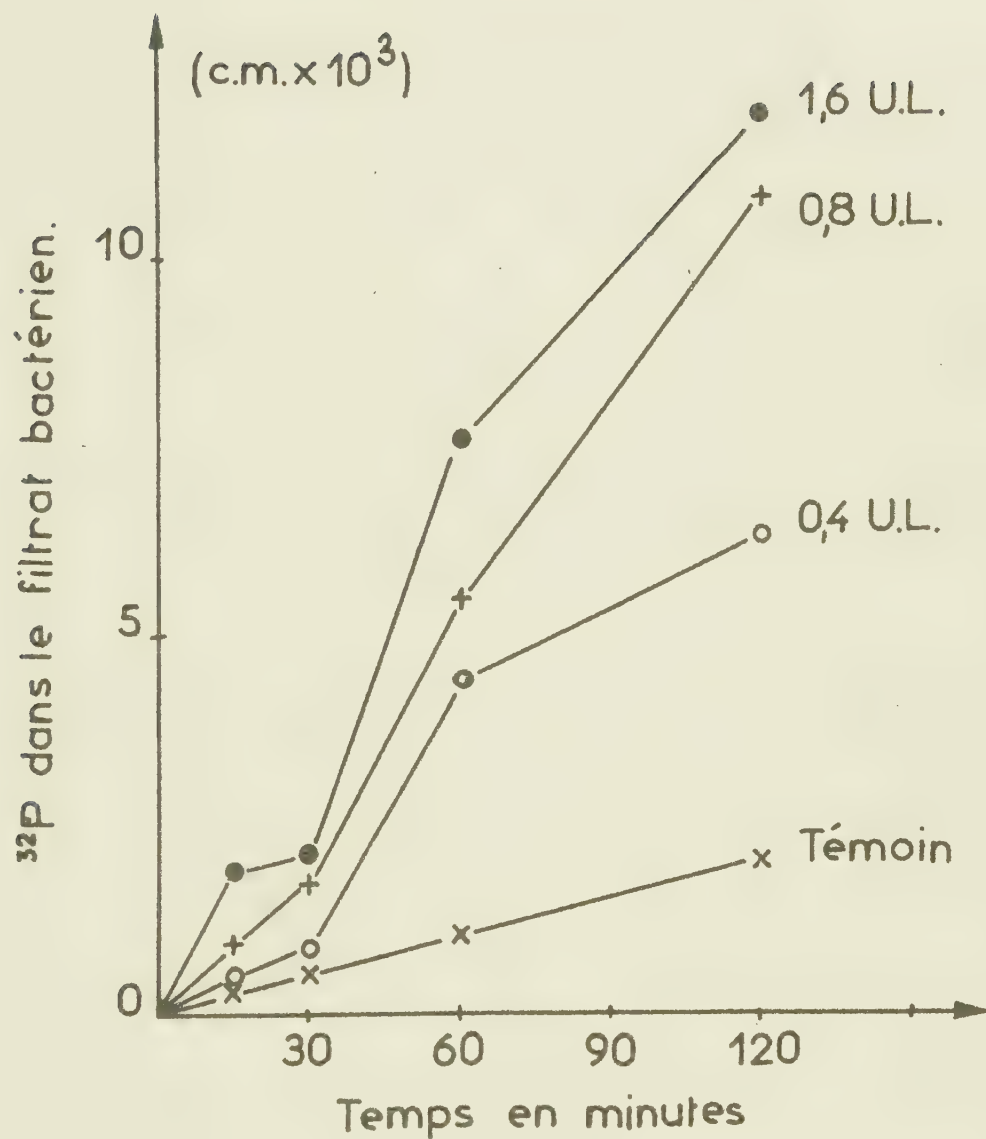


Fig.28.Sortie des métabolites phosphorés hors des bactéries traitées par la colicine K.

cines de type coup unique. Il est difficile d'établir dans ces expériences des relations quantitatives exactes car la sortie hors de la bactérie d'une grande diversité de constituants phosphorés dépend de plusieurs facteurs. D'ailleurs, la vitesse de sortie du ^{32}P est plus rapide à partir de 30 minutes d'action de la colicine (fig. 28) qu'au début de cette action.

TABLEAU XXI

Radioactivité des filtrats bactériens (c.m./ml $\times 10^{-3}$) après l'action de $1,5 \times 10^8$ U. L. de colicine K sur des suspensions de E. coli K12, contenant un nombre variable de bactéries (x).

Nombre de bactéries par ml $\times 10^{-8}$ (xx)	Durée de l'action de la colicine K		
	30 mn	60 mn	120 mn
1	32	72	96
2	54	100	160
4	39	83	128
8	38	108	190
(x) La radioactivité du filtrat des témoins a été soustraite des valeurs expérimentales.			
(xx) Avant l'action de la colicine la radioactivité de 10^8 bactéries est de $2,3 \times 10^5$ c.m.			

Lorsque toutes les bactéries ont fixé de la colicine, la quantité de ^{32}P qui sort de la bactérie en 2 heures est proche de la moitié de la quantité totale de ^{32}P présente initialement dans la bactérie.

Pour connaître la nature de ces métabolites phosphorés, une suspension de bactéries a été mise en contact avec une forte multiplicité de colicine K pendant 2 h. à 37°C, puis elle a été filtrée sur millipore O, 45 μ . Le matériel recueilli sur le filtre possède un rapport protéine sur acide nucléique six fois supérieur à celui des bactéries témoins. Ces produits ne sont cependant pas exclusivement nucléiques. Nous avons mis en évidence (chap. III) qu'il y avait parmi eux des phospholipides et principalement de la LPE. FIELDS et LURIA (1969) ont remarqué que les bactéries traitées par la colicine E1 libèrent des métabolites intermédiaires de la glycolyse tels que le glucose 6. phosphate, la dihydroxyacétonephosphate et le glycérrophosphate.

II - RESPIRATION

1) Technique

La respiration bactérienne a été étudiée par la méthode de Warburg. Une culture de E. coli K12 3000 en tryptose 1% à une densité optique de 0,125 est distribuée sous un volume de 1,8 ml dans les fioles de l'appareil de Warburg, 0,2 ml de colicine à une concentration de 100 U. L. par bactérie étant placée dans le diverticule latéral des fioles. Dans le cylindre central des fioles, un papier filtre imbibé de 0,2 ml de KOH 5N sert à absorber le gaz carbonique dégagé par les bactéries au cours de la respiration. Les fioles reliées aux manomètres sont agitées à 37°C dans un bain-marie. Le mélange colicine-bactéries est réalisé 30 mn après le début de l'incubation. Les différences de pression sont lues sur les manomètres toutes les 5 mn. La quantité d'oxygène consommée est calculée à l'aide de la formule donnée par UMBREIT et coll. (1964).

2) Résultats

Les résultats sont portés sur la figure 29. La colicine K provoque un arrêt immédiat de la consommation d'oxygène. Au contraire, les bactéries traitées par la colicine E2 présentent une intensité respiratoire identique à celle des bactéries-témoins pendant 40 minutes. Ensuite, l'intensité respiratoire n'augmente plus, mais elle ne présente à aucun moment une diminution compara-

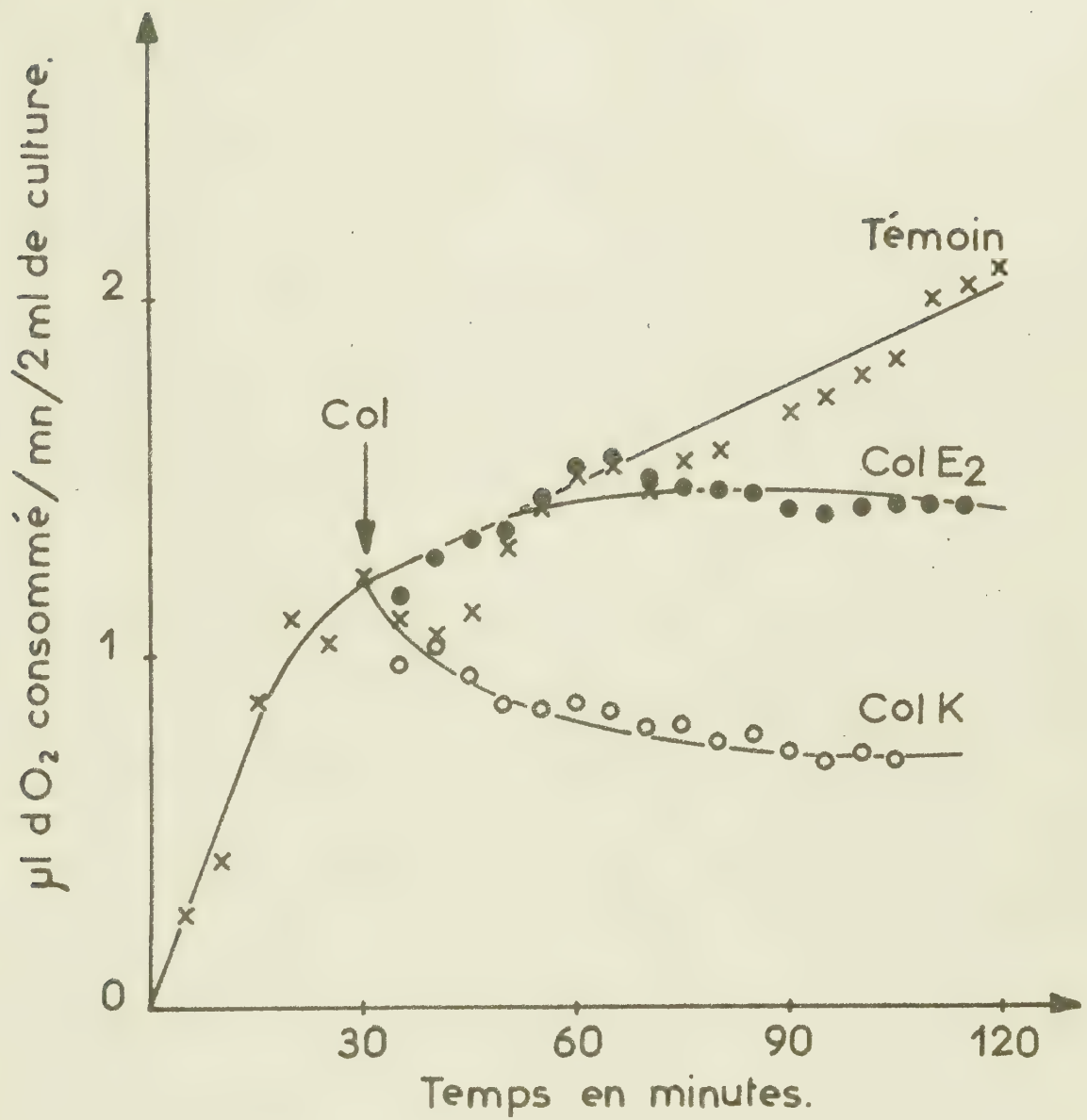


Fig.29. Consommation d'oxygène par les bactéries E.coli K₁₂ 3000 incubées avec ou sans colicine.

ble à celle provoquée par la colicine K.

DISCUSSION

La cinétique de la diminution de la densité optique des cultures incubées en présence de colicine est comparable à celle de l'augmentation du taux de LPE sous l'action des colicines. Elles débutent toutes deux dès les premières minutes de l'action des colicines et sont fonction de la durée d'action de la colicine et du nombre d'unités létales de colicine par bactérie. Elles sont toutes deux obtenues avec la plupart des colicines, mais pas avec la colicine E2.

Nous-mêmes (chap. V) et d'autres auteurs avons mis en évidence que les agents provoquant la lyse des bactéries : pénicilline, sphéroplast, bactériophages (RAMPINI, 1969) provoquent l'apparition d'un taux élevé de LPE. Il semble donc que la formation de LPE sous l'action des colicines soit la cause de la perte de matériel cellulaire par les bactéries. Les propriétés détergentes de la LPE peuvent transformer la perméabilité de la membrane. Il en est de même lors de l'action du complément (LUX et BARBU, 1967). Il faut noter que, lors de l'addition simultanée de colicine K et d'EDTA 0,01M sur une suspension bactérienne, il n'y a ni augmentation du taux de la LPE, ni diminution de la densité optique de la suspension. Pourtant, l'EDTA est connu pour augmenter la perméabilité de la bactérie (LEIVE, 1965). La colicine E2 qui ne provoque pas une augmentation du taux de la LPE parmi les phospholipides bactériens n'entraîne ni une perte de constituants phosphorés de la bactérie dans le milieu de culture, ni une chute de la densité optique de la culture bactérienne. Il y aurait donc bien une relation de cause à effet entre la formation de LPE et les troubles de la perméabilité cellulaire.

Cette hypothèse est à rapprocher de l'observation faite par SLEIN et LOGAN (1967) : en traitant *E. coli* avec une phospholipase exogène après traitement préliminaire avec l'EDTA, il y a une chute de densité optique de la culture proportionnelle à la quantité de phospholipase ajoutée.

Les colicines qui provoquent la formation de LPE inhibent la respiration bactérienne. Nous avons vu qu'il en était ainsi pour la

colicine K, FIELDS et LURIA (1969) ont montré que le taux de consommation d'oxygène des bactéries en présence de colicine E1 est fonction du milieu de culture où se trouvent les bactéries : il peut être plus élevé que celui des bactéries-témoins lorsque les bactéries sont privées d'acides aminés nécessaires ; il est peu affecté lorsque le glucose est la seule source d'énergie et il devient nul lorsque l'acétate est la seule source énergétique. Or , la colicine E1 agit de la même façon que la colicine K. Nous savons que dans des milieux sans source d'énergie, les proportions des phospholipides sont modifiées, mais qu'il n'y a pas d'augmentation du taux de LPE. Il se peut que la colicine agissant sur des bactéries en milieu privé d'acides aminés nécessaires, il n'y ait pas formation de LPE et pas de modification des activités de la membrane, en particulier de la respiration.

Dans le cas de la colicine E2, l'augmentation de l'intensité respiratoire des bactéries traitées accompagne l'accroissement de la synthèse des phospholipides ; La synthèse des phospholipides est un signe du développement de la membrane, et donc de l'accroissement de ses activités. Il faut toutefois noter que l'activité de la membrane sous l'action de la colicine E2 n'est plus en rapport avec la division bactérienne.

0
0 0

CONCLUSIONS.

- Les colicines provoquent des modifications de la perméabilité des bactéries.

- Lors de leur action, il y a une sortie importante de composés phosphorés bactériens dans le milieu de culture. Ces composés phosphorés sont en partie nucléotidiques.

- Il y a simultanément une diminution de densité optique de la culture traitée par la colicine.

La sortie de matériel phosphoré et la chute de densité optique sont en rapport direct avec la multiplicité de colicine utilisée.

- Un dosage des colicines a pu être mis au point par mesure de la diminution de la densité optique.

- La colicine E2 est la seule colicine que nous ayons étudiée qui ne provoque pas ces transformations de la perméabilité. Toutefois, elle peut les provoquer lorsqu'elle est ajoutée aux bactéries en présence de chloromycétine.

- La respiration des bactéries sensibles cultivées en tryptose 1% est semblable, sous l'action de la colicine E2, pendant 50 minutes, à celle des bactéries non traitées ; elle est ralentie par la suite.

- La consommation d'oxygène est par contre arrêtée dès les premières minutes de l'action de la colicine K.

CHAPITRE VII

INFLUENCE DE DIVERS AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR LA SENSIBILITE DES BACTERIES AUX COLICINES

Si des agents physiques ou chimiques pouvaient sauver les bactéries de l'action létale des colicines, des indications sur le mode d'action de celles-ci pourraient être obtenues. Aussi, avons-nous essayé de réaliser des conditions telles que les colicines ne puissent exercer leur action létale sur les bactéries sensibles, ceci soit en nous référant aux travaux de différents auteurs, soit d'après nos propres hypothèses sur le mode d'action des colicines.

Tout d'abord nous décrirons des expériences ayant trait au rôle de l'oxygène lors de l'action des colicines. L'influence de l'anaérobiose sur l'action de diverses colicines est étudiée, puis celle des antioxydants et des métaux divalents. La formation de peroxydes lors de l'action des colicines est recherchée.

Ensuite nous décrirons des expériences où une action enzymatique déclenchée par les colicines est impliquée. Pour essayer d'inhiber l'action phospholipasique due aux colicines, nous avons ajouté au milieu de culture du versène ou du saccharose. Afin d'éliminer les enzymes qui se trouvent dans la membrane et qui peuvent être démasqués par la colicine, les bactéries sensibles ont été soumises à un choc osmotique avant l'action des colicines.

Enfin nous avons cherché à savoir si les bactéries tuées par la colicine, ne libèrent pas une substance protégeant d'autres bactéries contre leur action.

I - ANAEROBIOSE

D'après NOMURA (1964), les colicines E1 et K inhibent les phosphorylations oxydatives car elles provoquent , dès les premières minutes de leur action, l'arrêt de toutes les synthèses macromoléculaires. LEVINTHAL et LEVINTHAL (communication personnelle citée par LURIA , 1964) ont montré que ces colicines n'arrêtent pas les synthèses macromoléculaires en anaérobiose. Nous avons tenté d'obtenir la survie des bactéries traitées par la colicine E1 en anaérobiose, la survie étant vérifiée par l'augmentation de la densité optique de la culture ou par l'obtention de colonies sur boîtes de gélose.

1) Anaérobiose en milieu liquide

E. coli K12 1000 ou E. coli ϕ est cultivé sous azote à 37°C dans un milieu tryptose 1%. La culture est refroidie à 10°C et distribuée , en présence d'air , dans des tubes de Thunberg à une densité optique de 0,05. Les dilutions de colicine E1 sont placées dans les diverticules latéraux des bouchons des tubes. Le vide est alors réalisé, puis l'azote est ajouté dans les tubes . Ceux-ci sont incubés à 37°C, le mélange colicine-bactéries est réalisé et la densité optique est mesurée à divers moments après le début de l'action de la colicine. Dans ces conditions , les mélanges bactéries-colicine ont des densités optiques plus proches des densités optiques des suspensions de bactéries-témoins qu'en aérobie. Mais les résultats sont difficilement interprétables : les bactéries se sont trouvées un court instant en présence d'oxygène ; Il est difficile de savoir si le milieu est complètement privé d'oxygène ; de plus, la croissance bactérienne sous azote est très ralentie, la densité optique atteignant rarement une valeur de 0,2.

2) Anaérobiose en milieu gélosé.

Les bactéries cultivées en anaérobiose sont étalées à la surface d'un milieu gélosé dans des boîtes de Pétri contenant de la colicine E1. Ces boîtes sont mises à incuber à 37°C dans un récipient étanche contenant de l'azote. Le milieu de culture gélosé a

été distribué dans des boîtes de Pétri en présence d'air, mais les boîtes sont séchées et conservées en absence d'oxygène. Que la colicine soit étalée à la surface des boîtes de Pétri ou placée dans des cavités faites dans la gélose, il est difficile de vérifier un effet protecteur de l'anaérobiose contre son action létale. Comparer l'action des colicines en aérobiose et en anaérobiose est très difficile : la vitesse de la multiplication bactérienne est plus rapide en présence d'O₂, la densité de la culture atteint une valeur plus élevée... Enfin², dans nos conditions, il est difficile d'être assuré d'une stricte anaérobiose.

Les travaux de FIELDS et LURIA (1969) confirment que la présence d'un " métabolisme à prédominance fermentatif " n'est pas suffisante pour conférer aux bactéries une entière résistance aux colicines.

II - ANTIOXYDANTS ET METAUX DIVALENTS

Si l'anaérobiose peut protéger les bactéries contre l'action de certaines colicines, c'est que l'action létale des colicines sur les bactéries se fait par l'intermédiaire d'oxydations et peut-être même de peroxydations. Aussi avons-nous cherché à inhiber ces oxydations à l'aide d'anti-oxydants ou à les perturber en ajoutant des métaux divalents.

1) Antioxydants

L'antioxydant utilisé est le tocophérol. Utilisé à la concentration de 1%, il ne protège pas les bactéries de l'action de la colicine. Mais s'il est ajouté en même temps que du SO₄Mn 10⁻⁵ M, les bactéries deviennent 4 fois plus résistantes à la colicine E1.

2)- Métaux divalents

Si du SO₄Mn 10⁻⁵ M est ajouté au milieu de culture, il faut employer une concentration en colicine E1 deux fois supérieure à celle utilisée avec le milieu de culture sans SO₄Mn pour obtenir le même taux de mortalité.

L'addition de $\text{SO}_4\text{Fe } 10^{-4}\text{ M}$ semble également protéger les bactéries contre l'action de la colicine E1, car les modifications des phospholipides bactériens qui ont lieu lors de l'action de la colicine E1 sont moins importantes : il y a encore une augmentation du taux de DPG, mais elle est inférieure à celle trouvée pour la colicine E1 seule : le pourcentage de ^{32}P dans le DPG est de 14% au lieu de 17% après 30 mn d'incubation; mais surtout il n'y a pas d'augmentation du taux de la LPE : le pourcentage de ^{32}P dans la LPE est de 1,7% au lieu de 6%. Il n'y a cependant pas inactivation de la colicine par les cations divalents (DANDEU, 1969).

III - RECHERCHE DES PEROXYDES

Les peroxydes ont été recherchés à l'aide d'un dosage en présence d'acide thiobarbiturique. Des cultures bactériennes de E. coli K12 traitées par les colicines E1, E2 et K n'ont pas produit de peroxydes dosables par cette technique, même pour des concentrations en bactéries de l'ordre de $5 \cdot 10^{10}$.

IV - LE CHOC OSMOTIQUE

Les travaux de NEU et HEPPEL (1965), NOSSAL et HEPPEL (1966) ont démontré que, lorsque les bactéries sont soumises à un choc osmotique, les enzymes situés dans la membrane ou au niveau de la membrane sont libérés dans le milieu de culture ; telles la phosphatase alcaline, la ribonucléase... ; les bactéries restent viables. RAMPINI (résultats non publiés) a montré qu'une lysophospholipase pouvait être ainsi libérée dans le milieu de culture. Ces enzymes pourraient éventuellement jouer un rôle dans l'action des colicines en étant démasqués ou rendus accessibles à leurs substrats. NOSE et coll. (1966) avaient émis une hypothèse comparable pour expliquer la dégradation de l'ARN ribosomal par la colicine E2 dans le cytoplasme : la ribonucléase de la membrane serait libérée dans le cytoplasme de la bactérie lors de l'action de cette colicine.

Le mode opératoire est le même que celui utilisé par NEU et HEPPEL. Les bactéries K12 3000 sont laissées 10 mn à 24°C

en présence de 20% de sucrose en tampon Tris 0,033 M pH 7,1 avec ou sans EDTA 10^{-4} M. Elles sont centrifugées et reprises dans du $MgCl_2$ $5 \cdot 10^{-4}$ M 10mn à 0°C, puis elles sont centrifugées. Les colicines A, E1 et K ont été dosées sur des bactéries ainsi traitées : aucune diminution d'activité n'a ainsi pu être observée.

DISCUSSION

La plupart des essais que nous avons entrepris afin de protéger les bactéries contre l'action létale des colicines ont été vains. Nous avons également pensé que les bactéries tuées par les colicines pouvaient libérer une substance protégeant d'autres bactéries contre les colicines, substance qui serait comparable à l'interféron. Les surnageants de centrifugation des bactéries tuées n'ont pas montré d'action protectrice vis-à-vis de nouvelles bactéries.

Ainsi seule l'action des métaux divalents peut être efficace contre les colicines. Cette action est à rapprocher de celle décrite par Mc KNIGHT et coll. (1965) pour protéger les mitochondries contre une peroxydation lipidique. Celle-ci entraînait une chute de densité optique de la suspension de mitochondries (comme le fait la colicine sur les bactéries sensibles), qui était abolie, soit par l'EDTA, soit par les antioxydants et le Mn^{++} soit par l'anaérobiose. Mais ces différents facteurs ne protègent peu ou pas les bactéries de l'action létale des colicines et un autre mode d'action doit être envisagé.

Le rôle de l'oxygène lors de l'action des colicines reste à élucider. On sait que les mutants tolérants aux colicines présentent une sensibilité particulière aux accepteurs d'hydrogène et plus généralement aux colorants d'oxydo réduction telles que le bleu de méthylène, l'acridine... (CLOWES, 1965). De plus, les colicines ont besoin d'une source d'énergie pour exercer leur action (NOMURA 1964; Chap. III, VI). L'action *primum movens* des colicines doit être peu importante quantitativement et, de ce fait, difficile à mettre en évidence.

CONCLUSIONS

- Un métabolisme à prédominance anaérobie ne peut sauver les bactéries contre les colicines E1, E2 et K

- Le tocophérol n'a un rôle protecteur des colicines que lorsqu'il est ajouté au $\text{SO}_4\text{Mn } 10^{-5}\text{M}$.

-- Le SO_4Mn et le SO_4Fe peuvent augmenter la résistance des bactéries à la colicine E1.

- Des peroxydes éventuellement formés après action de la colicine ont été recherchés, mais en vain.

- Les bactéries sont toujours sensibles aux colicines A, E1 et K lorsqu'elles ont été soumises au préalable à un choc osmotique.

DISCUSSION

Comment à partir d'un point de la surface bactérienne, une protéine peut-elle provoquer des perturbations dans le métabolisme de la bactérie, perturbations si importantes que la bactérie ne peut survivre ? Les colicines en effet tuent les bactéries sensibles sur lesquelles elles sont fixées. Les processus biochimiques qui causent la mort de la bactérie diffèrent selon la nature de la colicine. Mais toutes les colicines ont en commun d'agir selon une cinétique de coup unique et de n'agir que sur des bactéries en croissance.

Nous examinerons tout d'abord les problèmes posés par la fixation des colicines sur les bactéries avant de décrire et d'interpréter toutes les étapes biochimiques qui causent la mort de bactéries sensibles. Ensuite nous présenterons un modèle permettant d'expliquer le processus de l'action létale des colicines.

I - Fixation des colicines

1) Récepteurs

Quelle est la nature des récepteurs des colicines et où sont-ils situés ?

Une nature lipopolysaccharidique ayant été trouvée pour les récepteurs des phages (BEUMER et coll. 1966, LOSICK and ROBBINS 1969), une même nature pouvait être envisagée pour les récepteurs des colicines, compte tenu de l'analogie existant entre ces récepteurs. De plus, un même récepteur peut être commun à un phage et à une colicine : il en est ainsi pour la colicine K et le phage T6, pour les colicines E et le phage BF 23 (FREDERICQ, 1949a, 1949b,). Les travaux de Mme MAROTEL-SCHIRMAN et BARBU (1969) ont démontré que les colicines A, E1 et K peuvent être inactivées par des lipopolysaccharides

(LPS) bactériens , la partie du LPS jouant le rôle de récepteur étant la partie KDO (céto-désoxyoctonate) - lipide A. La non spécificité de l'interaction KDO - lipide A - colicine suggère aux auteurs de ces travaux que cette interaction ne doit avoir lieu que dans une étape secondaire, après la fixation des colicines sur des récepteurs spécifiques qui doivent être adjacents au LPS. (Cette hypothèse est en accord avec le mode d'action des colicines : les colicines A, E1 et K ont le même mode d'action et pourraient interagir avec un même composé ; la colicine E2 qui a un mode d'action différent de celui des colicines A, E1 et K n'est pas inactivée par le KDO - lipide A).

Les colicines ont beaucoup d'affinité pour les polysaccharides (DANDEU, 1969), mais ceux-ci ne les inactivent pas. Ainsi la colicine K peut être associée à l'antigène O et rester active (HINSBILL et GOEBEL, 1964). (Cependant, selon GUTERMAN et LURIA (1969), les LPS de certains mutants de *E. coli* inactivaient la colicine B.) La présence de chaînes latérales de sucres dans le core du LPS diminue l'inactivation des colicines par le LPS (MAROTEL-SCHIRMAN et BARBU, 1969) : c'est ce qui se passe sur les bactéries smooth qui sont de ce fait résistantes à l'action de la colicine. Aussi, le rôle de récepteurs de colicines ne peut être actuellement attribué aux polysaccharides bactériens, bien que leur structure eusse pu expliquer la spécificité de ces récepteurs.

Une nature protéinique serait compatible avec la spécificité très étroite du récepteur de colicine . On sait que certains phages ont des protéines pour récepteurs : ainsi le phage $\phi 1$ s'attache au sommet des F pili, le phage R17 sur les côtés de ces F pili. Le F pilus lui-même possède un récepteur protéinique à la surface des bactéries F^+ (BRINTON, 1965) : or la conjugaison bactérienne provoque une bactériostase chez les bactéries F^- : cette bactériostase ne s'arrête qu'avec la rupture de l'interaction du F pilus avec son récepteur ; cette action bactériostatique peut être considérée , dans une certaine mesure , comme " colicine-like ".

Où sont situés ces récepteurs ? Dispersés uniformément à la surface de la bactérie ou rassemblés à des emplacements stratégiques, importants pour le développement de la bactérie ? L'isolement des récepteurs permettra de répondre à cette question. Les LPS qui sont impliqués dans l'action ou la fixation des colicines, sont répartis sur toute la surface bactérienne (WEIDEL et PELZER, 1964). Mais on peut supposer que les récepteurs primaires des colicines sont situés sur des emplacements privilégiés de la surface bactérienne, sur des organes qui jouent un rôle lors de la croissance cellulaire. Selon la théorie de JACOB, BRENNER et CUZIN (1963), la membrane joue un rôle capital dans la division cellulaire. La division du mésosome est reliée à la duplication de l'ADN ; la croissance cellulaire se faisant entre les 2 mésosomes néosynthétisés qui s'éloigneraient ainsi l'un de l'autre. La bactérie posséderait alors deux noyaux et deux mésosomes ; un septum se formerait entre les deux mésosomes au centre de la membrane néosynthétisée, individualisant deux bactéries-filles. Ainsi l'emplacement du mésosome est un site stratégique de la surface bactérienne, pour agir sur la division et sur la croissance bactérienne. RYTER et JACOB (1966) ont démontré que le chromosome bactérien est, effectivement, lié à la membrane par le mésosome chez *B. SUBTILIS*.

Le mésosome de *E. coli* est-il accessible de l'extérieur de la bactérie ? Et pourrait-il contenir les récepteurs des colicines ? Cette hypothèse serait séduisante pour expliquer le déclenchement de l'action et l'action des colicines sur la croissance bactérienne. Le fait que la majorité des récepteurs des phages ait pu être localisée sur des sites quelconques de la membrane n'est pas un argument en faveur de cette hypothèse ; car certaines colicines possèdent le même récepteur que certains phages. Mais ceci pourrait être envisagé pour des colicines ayant très peu de récepteurs : la colicine A par exemple.

2) L'unité létale

La quantité de colicine nécessaire et suffisante pour tuer une bactérie est une unité létale de colicine (JACOB et coll. 1952).

Connaissant le poids moléculaire d'une colicine, la concentration et l'activité d'une préparation de colicine, on peut savoir à combien de molécules correspond une unité létale.

MAEDA et NOMURA (1966) calculèrent que une U. L. de leur préparation de colicine E2 devait contenir 100 molécules de colicine. DANDEU(1969) a obtenu des préparations de colicine purifiée contenant : 20 molécules de colicine par U. L. de colicine K, 150 molécules par U. L. de colicine E1 et 200 molécules par U. L. de colicine A. Ceci veut dire qu'une molécule de colicine sur 20 ou sur 200 selon la préparation de colicine utilisée, provoque une action létale sur la bactérie sur laquelle elle est fixée. Les autres molécules contenues dans l'unité létale se fixeraient sur la bactérie, mais n'auraient aucun rôle dans l'action létale. Ceci en raison de leur faible probabilité d'action. (Il se peut que ceci soit dû, dans quelques cas, à une inactivation de la colicine lors des travaux de purification. Pour MITUSI et MIZUNO (1969), la dénaturation des molécules de colicine est suffisante pour expliquer la faible probabilité d'action de la colicine E2.)

Les résultats de DANDEU (1969) sur la colicine A ont été établis d'après les dosages d'U. L. de colicine A faits selon la méthode turbidimétrique standard décrite au chapitre I. Or, nous avons démontré (chap. II) que, pour doser des U. L. réelles de colicine A, il faut utiliser des concentrations bactériennes 50 à 200 fois plus élevées que dans le dosage standard ; ceci afin que toute la colicine ajoutée soit fixée avant la détermination du nombre de bactéries survivantes. Ainsi, si la préparation de colicine A réalisée par DANDEU contient 200 molécules par " U. L. arbitraire ", elle doit en contenir de 1 à 10 par U. L. réelle. La colicine A pourrait être une colicine pour laquelle 1 U. L. correspond bien à une molécule, cette molécule ayant une probabilité d'action de 100%.

Dans le cas des autres colicines, la faible probabilité d'action d'une molécule de colicine peut être imputable à la faible proportion de récepteurs " létaux " à la surface de la bactérie ;

la majorité des molécules se fixent alors sur les récepteurs non létaux, récepteurs qui ne sont pas en liaison avec un ou des composés nécessaires à l'action de la colicine fixée. On peut aussi supposer que tous les récepteurs sont identiques, qu'ils sont associés aux composés nécessaires à l'action de la colicine, mais qu'ils ne se trouvent pas sur un emplacement stratégique, comme par exemple le mésosome, d'où la colicine fixée pourra déclencher son action.

Or, selon la souche sensible utilisée, le nombre de molécules de colicine entrant dans la composition de une U. L., peut varier de façon importante. Par exemple, une U. L. de colicine K correspond à un nombre plus petit de molécules lorsqu'elle est déterminée sur *E. coli* φ que lorsqu'elle l'est sur *E. coli* K12 1000 ou *E. coli* K12 (col E2) + (chap. I). La plus grande différence entre les nombres de molécules contenues dans une même U. L. de colicine étant obtenue par dosages de cette U. L. sur une souche sensible et sur une souche immune, c'est-à-dire colicinogène pour la colicine dosée. Par exemple, la quantité de colicine I nécessaire pour tuer une bactérie productrice de cette colicine est de 30 à 40 fois plus grande que celle utilisée pour tuer une bactérie sensible (LEVISOHN et coll. 1968). Or la cinétique de l'action de la colicine reste du type coup unique. Il faut donc supposer que la probabilité d'action d'une colicine a diminué considérablement, ceci en raison d'un ou de plusieurs caractères génétiques de la bactérie. Ce ou ces caractères génétiques confèrent à la bactérie une résistance très spécifique à une colicine (la résistance n'est pas totale) puisque l'immunité à une colicine E protège peu la bactérie contre les autres colicines E qui ont pourtant les mêmes récepteurs, c'est-à-dire qui ont pour point de départ de leur action un même site. La probabilité d'action plus ou moins grande d'une molécule de colicine est bien due aux propriétés de la bactérie sensible ; la structure des récepteurs doit être inchangée, mais leur situation pourrait être modifiée : la majorité des récepteurs étant situés à la surface bactérienne à un endroit défavorable au déclenchement de l'action de la colicine (ou n'étant pas associés avec les molécules néces-

saires à l'interaction avec la colicine fixée), ou bien la constante d'affinité des récepteurs pour la colicine étant particulièrement faible, rendant l'association colicine-récepteur peu stable ou plus vraisemblablement, inapte à toute interaction ultérieure de la colicine fixée. La fixation de la colicine sur des bactéries colicinogènes immunes pourrait même être réversible, comme le laisse supposer, dans notre travail, (chap.II), la fixation de colicine par les bactéries colicinogènes. Dans ce cas, seule la molécule qui ne se détacherait pas du récepteur pourrait déclencher l'action létale. Cette hypothèse n'est valable que pour expliquer la très faible probabilité d'action d'une molécule de colicine sur une souche immune, mais non pour expliquer les différences entre les probabilités d'action d'une molécule sur deux souches sensibles.

La probabilité d'action de la molécule de colicine fixée peut être nulle lorsque celle-ci se fixe sur des mutants tolérants ou réfractaires aux colicines. Ceci est dû à la perte ou à l'altération d'une (ou de plusieurs) protéine nécessaire à une étape quelconque , mais précoce de l'action des colicines. Ce ne peut être dû à une modification de la structure du récepteur puisque les molécules de colicine se fixent sur ces mutants comme sur les bactéries sauvages , c'est-à-dire irréversiblement (NOMURA et coll. 1965). Mais l'emplacement des récepteurs peut s'être trouvé éloigné de la membrane lipidique avec laquelle doit interagir la colicine fixée, ou bien l'environnement des récepteurs peut être transformé et l'interaction de la colicine fixée avec la membrane ne peut avoir toutes les conséquences qu'elle a sur une bactérie sauvage. Une structure a été modifiée et une réaction ne peut se faire . Si une ou des réactions peuvent avoir lieu après la fixation de la colicine, elles sont très difficiles à mettre en évidence , en raison de leur importance quantitative très limitée. Tous, ou la majorité des mutants tolérants isolés présentent des modifications de leur membrane, en particulier une sensibilité accrue aux colorants d'oxydo-réduction (CLOWES, 1965 ; HILL & HOLLAND, 1967 ; RAMPINI et coll., 1967 ; NAGEL de ZWAIG et LURIA, 1967 , 1969). Une mutation d'un seul caractère suffit à

provoquer la tolérance d'une bactérie. Ceci est prouvé par l'existence de mutants tolérants thermolabiles et de mutants qui ont acquis par une seule mutation la tolérance à plusieurs colicines (RAMPINI et coll. 1967 , NOMURA & WITTEN, 1967, NAGEL de ZWAIG & LURIA , 1967). Le fait que ces différents auteurs aient pu isoler différentes classes de mutants tolérants démontre que dans chaque classe de mutant , une étape différente de l'action de la colicine fixée est affectée. NOMURA & WITTEN (1967) proposent de classer les mutants tolérants en 3 groupes :

- 1) ceux chez qui la fixation de la colicine n'est suivie d'aucun événement (mutants tolérants à une seule colicine).
- 2) ceux qui ont un défaut dans une des étapes consécutives à la fixation des colicines (mutants thermolabiles : ils sont tolérants à certaines températures et sensibles à d'autres températures)
- 3) ceux qui présentent une altération génétique telle que le processus létal des colicines ne peut être déclenché : un mécanisme vital est altéré (mutants non viables et tolérants à 40°C, viables et sensibles aux colicines à 30°C.)

NAGEL de ZWAIG & LURIA (1967) classent au contraire les mutants tolérants d'après des critères génétiques : ils déterminent sur le chromosome bactérien l'emplacement de la mutation.

Tous les mutants tolérants isolés ayant une altération d'un composé de la membrane bactérienne autre que le récepteur de fixation d'une colicine , cela prouve que la probabilité d'action d'une molécule de colicine dépend de la structure de la membrane bactérienne à proximité du récepteur. Ceci est en accord avec une structure hétérogène de la membrane telle que celle envisagée par GREEN & FLEISHER (1963), BROWN (1965) , BENSON (1966), et non avec une structure homogène telle que celle proposée par DANIELLI & DAWSON (1935).

3) Effet de multiplicité

Une bactérie sensible est tuée par une U. L. de colicine ou, plus exactement, par une molécule parmi les nombreuses molécules que comprend l'U. L. Mais les perturbations provoquées dans le métabolisme de la bactérie sensible par une colicine seront amplifiées et plus précoces lorsqu'un grand nombre d'U. L. de colicine sera fixé sur celle-ci.

On appelle multiplicité le nombre d'U. L. ajoutées par bactérie sensible.

Une bactérie sensible possède un certain nombre de récepteurs pour une colicine donnée. Nous avons vu (chap. II) qu'une bactérie sensible peut fixer environ 600 U. L. de colicine K, 50 à 100 U. L. de colicine E et seulement de 1 à 5 U. L. de colicine A. Ainsi 600 récepteurs de la colicine K sur 12 000, si on considère que 1 U. L. de colicine K contient 20 molécules, sont des récepteurs " létaux ", c'est-à-dire situés sur des emplacements privilégiés. L'action létale peut partir de l'un quelconque d'entre eux. La vitesse à laquelle se produisent les transformations du métabolisme de la bactérie sensible augmente avec le nombre de récepteurs occupés, la vitesse la plus faible étant obtenue lorsqu'un seul de ces récepteurs est occupé. Selon NOMURA & MAEDA (1965), ceci est dû à ce que les récepteurs " létaux " étant répartis uniformément sur la membrane, l'ensemble de la membrane est plus vite transformé. Mais on peut également supposer que les récepteurs " létaux " sont situés sur un même emplacement privilégié (par exemple, sur le mésosome). La mort de la bactérie survenant plus rapidement lorsque les transformations provoquées sont plus importantes quantitativement à cet endroit, un grand nombre de récepteurs étant occupés. Dans le cas de la colicine A, un seul récepteur (ou, tout du moins, un nombre inférieur à 10) est situé à un endroit favorable de la surface bactérienne. Aussi l'addition d'une forte multiplicité de colicine A n'aura d'autre effet que d'accélérer la vitesse d'occupation de ce récepteur. L'unique récepteur de

la colicine A serait alors toujours fonctionnel et pourrait être comparé à celui du phage f1 qui se fixe au sommet du F pilus.

II - REACTIONS LETALES DECLENCHEES PAR LES COLICINES

D'après les travaux de NOMURA et coll . (1962, 1963 , 1965), ENDO, KAMIYA & ISHIZAWA (1963), FUJIMURA (1966) FIELDS & LURIA (1969) DANDEU, BILLAULT & BARBU (1969) et les nôtres(chap. III , IV , VI) , nous avons pu représenté dans le tableau XXII les différents processus biochimiques déclenchés dans une bactérie sensible après la fixation des colicines E1, E2 & K.

Les colicines E1 et K provoquent les mêmes perturbations du métabolisme bactérien bien que leur point de fixation sur la membrane soit différent. L'existence de mutants bactériens tolérants à la colicine K et sensible à la colicine E1, ou vice-versa (NOMURA & WITTEN, 1967) , l'immunité des bactéries colicinogènes pour une seule de ces deux colicines, permettent d'affirmer que leurs actions comportent cependant des étapes différentes. Ces étapes doivent être parmi les toutes premières.

1) Croissance bactérienne nécessaire pour l'action létale des colicines.

Les colicines ne peuvent déclencher des phénomènes létaux que lorsque les bactéries sont en phase de croissance. La probabilité d'action d'une molécule de colicine devient très faible lorsque les cellules sont en phase stationnaire ; il en est de même lorsque les cellules sont en absence d'énergie (chap. III, V) ou en présence de DNP ou d'azide. FIELDS & LURIA (1969) notent qu'en absence de source d'énergie, le taux de consommation d'oxygène est le même chez les bactéries traitées ou non traitées par la colicine E1. NOMURA & MAEDA (1965) soulignent la nécessité d'un apport énergétique pour les colicines E2 et E3. La synthèse de protéines n'est cependant pas nécessaire pour

TABLEAU XXII

Modifications du métabolisme des bactéries sensibles E.coli lors de l'action des colicines K, E1, E2.

Modifications métaboliques	ColK	ColE1	ColE2
Augmentation du taux de DPG	+	+	-
" " " de LPE	+	+	-
Arrêt des oxydations phosphorylantes	+	+	-
Arrêt de la respiration	+	+	-
Modifications de la perméation	+	+	-
Sortie de métabolites phosphorés	+	+	-
Sortie de potassium	+	+	-
" de TMG (thiométhylgalactoside)	+	+	-
Entrée de potassium	-	-	+
" de TMG	-	-	+
" de α MG (méthylgalactoside)	+	+	+
Arrêt des synthèses des phospholipides	+	+	-
" " " " protéines	+	+	+
" " " " d'ARN	+	+	+
" " " " d'ADN	+	+	+
" " " " métabolites phosphorés	+	+	-
" " " " contaminant les phospholipides			
" " " " métabolites phosphorés non nucléotidiques non lipidiques	-		
Dégradation de l'ADN	-	-	+
Induction du phage λ	-	-	+
Multiplication des phages virulents T	-	-	+
" " " à RNA			-

l'action des colicines car les bactéries sont tuées par celles-ci même en présence de chloromycétine. (La chloromycétine est d'ailleurs utilisée dans un dosage décrit dans le chapitre I).

Ceci peut s'expliquer en supposant que seul le fonctionnement normal de la membrane doit être assuré pour permettre l'action létale des colicines ; celles-ci agiraient sur une membrane en croissance (la chloromycétine n'arrête pas les synthèses des phospholipides); certains mouvements de la membrane pourraient même être indispensables pour permettre l'association de la colicine fixée avec ses récepteurs secondaires.

Il faut noter que, en présence des chloromycétine, les transformations du métabolisme bactérien provoquées par la colicine E2 sont plus nombreuses ; certaines sont alors comparables à celles provoquées par les oolicines K et E1 : sortie de métabolites phosphorés dans le milieu de culture, chute de la densité optique de la suspension bactérienne traitée, en particulier (chapitres I et VI).

NOMURA et NAKAMURA (1962) puis REYNOLDS et REEVES (1963) ont montré que, en présence de DNP ou d'azide, des bactéries sensibles peuvent être sauvées de l'action des colicines K ou E2 par la trypsine, plusieurs dizaines de minutes après la fixation de celles-ci. La trypsine hydrolyse la colicine fixée et la bactérie peut survivre si l'action de la colicine n'a pas dépassé un certain stade.

Selon REYNOLDS & REEVES (1963) et FAGUET (1967), en phase de croissance exponentielle à 37°C, l'étape irréversible de l'action des colicines est atteinte plus ou moins lentement. Nous avons montré (J. MAROTEL-SCHIRMAN, D. CAVARD, L. SANDLER & E. BARBU (1970)) que la vitesse d'apparition de cette étape est différente selon les colicines : la colicine K provoque

très rapidement cet état d'irréversibilité (en 2 mn, 85% des bactéries sont irrécupérables) la colicine E2 le plus lentement, (en 2 mn, 10 à 15 % seulement des bactéries sont irrécupérables); la colicine E1 avec une vitesse légèrement inférieure à celle de la colicine K. Avec les bactéries en phase stationnaire , l'addition de la trypsine sauve encore des bactéries lorsqu'elle est ajoutée 30 minutes après la colicine K.

Une hypothèse peut être envisagée pour expliquer l'étape irréversible de l'action de toutes les colicines. On peut envisager que la bactérie ne serait plus, à un moment donné , 'sauvée de l'action de la colicine par la trypsine, la colicine n'étant plus accessible à cet enzyme, ayant pénétrée à l'intérieur de la bactérie, la croissance bactérienne étant indispensable pour cette pénétration. Cela expliquerait également la faible probabilité d'action des molécules de colicines, la majorité des molécules de colicine ne pouvant pénétrer. Seules des expériences faites avec des colicines radioactives pourraient donner des arguments en faveur de cette hypothèse. MAEDA & NOMURA (1966) ont préparé et utilisé de la colicine E2 marquée avec de la leucine tritiée; ils n'ont pu ni infirmer ni confirmer cette hypothèse. La pénétration d'une seule molécule est difficile à mettre en évidence.

Mais tout laisse supposer que la colicine reste à l'extérieur de la bactérie. Tout d'abord, son poids moléculaire de 60 000. On sait que des ADN de poids moléculaire supérieur à ce dernier peuvent pénétrer dans une bactérie et la transformer, mais la structure de l'ADN permet cette pénétration. Par contre , il n'est aucun exemple de passage ou de transport actif d'une protéine exogène de l'extérieur à l'intérieur d'une bactérie.

De plus, les agents qui ont une action létale de type coup unique semblable à celle de la colicine (certains phages défectifs, les " ghosts " de phages virulents) agissent de l'extérieur de la bactérie, à partir de leur récepteur.

2) Chronologie des réactions déclenchées par les colicines.

Entre la fixation de la colicine et l'étape irréversible de son action, que se passe-t-il ?

- Aucun évènement n'a lieu. C'est à l'occasion des mouvements de la membrane ou des changements de composition ou de structure de celle-ci, ou d'un moment favorable à la croissance bactérienne, que la seule action engagée par la colicine fixée a lieu; l'étape irréversible est enclenchée.

- Un ou des évènements ont lieu. L'étape irréversible est provoquée lors de la formation ou la transformation d'une molécule ou lors de la formation d'une certaine quantité de ces molécules. En deçà, il y aurait réversibilité.

C'est cette hypothèse qui est retenue dans les deux théories actuelles expliquant le mode d'action des colicines. Selon NOMURA (1964), la fixation d'une U. L. de colicine provoque un changement réversible du site récepteur. Ce changement provoque la transmission d'un " signal " le long de la membrane, signal qui provoque des transformations de la membrane lorsqu'il atteint certains sites privilégiés que NOMURA désigne par le terme de " cible létale " Une " cible létale " est une protéine ou un ensemble de protéines dont l'inactivation ou la transformation provoque la mort de la bactérie. La transmission de ce signal pourrait être gênée chez les bactéries colicinogènes. Ses effets sur les bactéries sensibles pourraient être réversés par la trypsine tant qu'il n'aurait pas provoqué de transformations métaboliques trop importantes.

CHANGEUX & THIERY (1967) expliquent l'action létale des colicines par une transformation des protéines de la membrane consécutive à la fixation de la colicine sur son récepteur, cette transconformation n'étant létale pour la bactérie que lorsqu'elle a affectée un grand nombre de molécules.

La seule réaction provoquée par les colicines , parmi celles rapportées dans le tableau XXII, qui peut être réversible est

la formation d'un taux élevé de DPG. Nous avons vu (chap. V) que l'absence de source d'énergie et l'action du DNP provoquent chez les bactéries un accroissement du taux de ce phospholipide. Or l'effet de ces deux agents peut être reversé en plaçant les bactéries dans un milieu de culture neuf.

Mais l'augmentation du taux de DPG provoquée par les colicines est toujours accompagnée de l'augmentation du taux de LPE. Les cinétiques (chap. III) ne nous permettent pas de dire que la concentration d'un de ces deux phospholipides augmente avant celle de l'autre. Les deux effets semblent simultanés. Or ils apparaissent ainsi simultanément chaque fois qu'il y a mort de la bactérie (chap. V). Aussi ils peuvent, soit constituer l'étape irréversible, soit se situer après celle-ci.

Les premiers événements déclenchés lors de l'action de la colicine doivent avoir lieu dans la membrane bactérienne, la colicine y étant fixée. Le fonctionnement de la membrane est conditionné par sa structure, et tout remaniement de celle-ci doit précéder l'altération du fonctionnement. Ainsi, les transformations des phospholipides qui apparaissent dès les premières minutes de l'action de la colicine doivent précéder les autres événements. Ces derniers peuvent n'être que des répercussions de l'apparition des taux élevés de DPG et de LPE.

D'après LEVINTHAL & LEVINTHAL (cités par LURIA, 1964) l'arrêt des oxydations phosphorylantes serait la première réaction, et la seule, déclenchée par la colicine E1 : cet arrêt provoquerait le blocage simultané des synthèses de protéines, d'ADN, et d'ARN par cette colicine. NOMURA (1964) utilise cette même hypothèse pour expliquer l'action de la colicine K. FIELDS & LURIA (1969) ont mis en évidence une diminution très importante du taux d'ATP lors de l'action des colicines E1 et K. Une faible quantité d'ATP continue à être synthétisée, principalement par la glycolyse, ce qui explique que certaines synthèses puissent avoir lieu et que certains systèmes de transport puissent fonctionner. Pour tous ces auteurs, ainsi que pour REEVES (1968), l'arrêt du fonctionnement de la chaîne respiratoire est le premier phénomène déclenché par les colicines E1 et K.

Le principal évènement provoqué par la colicine E2 est la dégradation de l'ADN. Cette dégradation se produit, à 37°C, 30 mn après la fixation de la colicine E2 (MAEDA & NOMURA , 1966). Même en admettant une action très lente de cette colicine, (nous avons vu par l'addition de trypsine que , lors de l'action de cette colicine, l'étape irréversible n'apparaît que très tardivement), il est vraisemblable que des réactions doivent précéder l'action de la désoxyribonucléase (D. NASE), si cet enzyme est le responsable de la dégradation de l'ADN. Est-ce que cette DNase (ou une autre nucléase) est néosynthétisée ? Est-ce qu'au contraire les inhibiteurs des DNases et nucléases sont détruits ? NOMURA & MAEDA (1965) ont démontré qu'à haute multiplicité de colicine E2, la consommation d'oxygène n'est pas arrêtée, mais les synthèses de protéines, d'ADN et d'ARN s'arrêtent ; à faible multiplicité il n'y a pas d'arrêt de ces synthèses. Ces auteurs ainsi que ENDO et coll., (1963) ont montré que la colicine E2 provoque l'induction du phage λ chez les bactéries lysogènes.

Nous avons montré (chap.III) que, lors de l'action de la colicine E2, la synthèse des phospholipides est peu changée; cependant le PG semble avoir un turnover augmenté.

L'oxygène pourrait jouer un rôle dans l'action de cette colicine. Il pourrait être impliqué dans des oxydations ou des peroxydations provoquées par la colicine E2. En effet, on sait que les agents inducteurs tels que les U.V., les rayons X , l'eau oxygénée, agissent par l'intermédiaire de peroxydes qui provoquent la rupture du DNA (LWOFF, 1953). La colicine E2 provoque, comme ces agents , l'induction du phage λ chez les bactéries lysogènes. La dégradation de l'ADN qu'elle provoque également pourrait ainsi être due , non à l'action d'une nucléase, mais à la formation de peroxydes. Le substrat de ces peroxydations serait-il des acides gras ? La recherche en a été faite par BEREZIAT et BARBU (résultats non publiés), mais aucun acide gras peroxydé n'a pu être détecté.

Il est intéressant de noter que HOLLAND & THRELFALL (1969) ont mis en évidence que les gènes contrôlant le caractère

réfractaire (tolérant) à la colicine E2 étaient étroitement liés (et peut être confondus) avec les gènes contrôlant la sensibilité aux U. V.

III - MODELE D'ACTION DES COLICINES.

Nous distinguerons plusieurs étapes dans l'action des colicines :

- 1) la fixation d'une molécule de colicine
- 2) une ou des étapes réversibles ou initiation
- 3) l'étape irréversible ou amorce de l'action
- 4) les étapes létales.

Il est difficile de dire si les 2° et 3° étapes ne sont pas confondues. A partir de la 3° étape , l'action létale de la colicine ne pourrait plus être arrêtée (sauf peut-être chez certains mutants tolérants), ni réversée par la trypsine. Ce serait ainsi l'étape-clé de l'action de la colicine. Ce serait elle qui aurait besoin de la croissance bactérienne. Des hypothèses peuvent être faites pour expliquer chaque étape.

1) La fixation

C'est la seule étape qui ne nécessite aucune énergie. Elle peut se faire sur des bactéries tuées par la chaleur ou formolées. Les protéines de surface de ces bactéries sont ou doivent être dénaturées ou altérées. Les protéines sont cependant les meilleurs candidats pour expliquer la spécificité de la fixation et les les répercussions de cette fixation.

2) Initiation de l'action de la colicine

Aucun évènement ne se passerait pendant cette seconde étape. Seule pourrait avoir lieu l'interaction de la colicine fixée avec son récepteur secondaire. La colicine fixée aurait besoin, pour déclencher son action de la présence (ou de l'absence) dans son environnement proche , de certains composés. Ces composés apparaîtraient ou disparaîtraient à certains moments de la croissance cellulaire.

En effet , la composition de la membrane diffère selon l'état physiologique de la bactérie.

De nombreux auteurs (CRONAN, 1968, BEREZIAT, thèse de doctorat en médecine , sous presse), ont montré que la composition en acides gras varie selon les différentes étapes de la croissance bactérienne. Les acides gras insaturés, abondants pendant la phase de croissance exponentielle, disparaissent au profit d'acides gras cycliques (propaniques) pendant la phase stationnaire.

La composition en phospholipides est également dépendante du développement bactérien. Nous avons montré (chap. V.) que l'absence de source d'énergie ou l'addition de DNP provoquent une augmentation importante du taux de DPG. Cette même transformation a été décrite comme survenant pendant la phase stationnaire (AMES 1968, RANDLE et coll. 1969).

Une phase lag peut entraîner d'autres profondes modifications de la structure de la membrane. Par exemple, la privation en acide aminé indispensable d'une bactérie *E. coli* exigeante en cet acide aminé, provoque la formation de vésicules contenant des lipides, des protéines et des LPS et leur excrétion dans le milieu de culture (KNOX et coll. 1967).

Il est bien certain que ces changements de structure doivent être en relation avec des changements de fonction. Mais ils peuvent être à eux seuls suffisants pour empêcher le déclenchement ou l'amorçage de l'action de la colicine.

Ainsi, la colicine ne pourrait déclencher son action que si la concentration en DPG près de son récepteur ne dépasse pas un certain taux. Cela expliquerait la faible proportion de molécule de colicine fixée qui peuvent tuer la bactérie, la majorité des molécules étant située sur des récepteurs entourés de DPG. La différence de sensibilité aux colicines des souches d'*E. coli* s'expliquerait de la même façon : la souche la moins sensible ayant un taux élevé de DPG, ou, tout du moins , un taux de DPG élevé à proximité des récepteurs des colicines.

Ensuite, l'amorce de l'action de la colicine étant l'activation ou le démasquage d'une phospholipase, la composition en acide

gras des phospholipides pourrait jouer un rôle important . Les phospholipases détachent préférentiellement les acides gras insaturés et ne pourraient agir sur des phospholipides ayant des acides gras cycliques.

Cette étape ne serait pas réalisée avec la même vitesse pour toutes les colicines. C'est ce que montrent les expériences de réversion avec la trypsine. Ceci serait dû au nombre et à l'emplacement des récepteurs : la colicine K ayant un grand nombre de récepteurs, les chances d'une molécule de colicine de se fixer sur un récepteur autour duquel sont réalisées les conditions nécessaires au déclenchement de son action doivent être plus grandes que pour la colicine A qui n'a qu'un seul récepteur. Dans ce dernier cas, les conditions ne sont réalisées qu'à certains moments selon le turnover des phospholipides. Celui-ci est en effet faible mais non négligeable.

Une étape de cette nature ne peut être envisagée lors de l'action de la colicine E2. Cette colicine ne provoque des réactions irréversibles que très tardivement. Les synthèses macromoléculaires (protéines et acides nucléiques , NOMURA , 1965) et phospholipidiques (chap.III) n'étant pas arrêtées lors de son action, il semble qu'elle n'agisse que sur le contrôle de la division cellulaire et ce , peut-être qu'à un moment donné de cette division. Par exemple , la colicine E2 ne pourrait déclencher son action qu'au moment de l'initiation de la réplication de l'ADN. La synthèse du chromosome ne se faisant pas d'une façon synchrone dans la population bactérienne soumise à l'action de la colicine , les différences de vitesse pour l'obtention de l'étape irréversible pourrait ainsi être expliquées. Serait également expliqué la faible sensibilité des bactéries qui ne sont pas en phase de croissance : ces bactéries peuvent terminer la synthèse de leur ADN , mais ne peuvent pas commencer une nouvellesynthèse. Cependant, les bactéries en phase stationnaire ont un taux de DPG élevé, ce qui n'est pas le cas des bactéries traitées par la colicine E2.

3)- Amorce de l'action de la colicine

Cette troisième étape ne serait réalisée que par une faible

proportion de molécules de colicine : celles qui provoquent l'action du coup unique. Elle constituerait l'étape irréversible de l'action des colicines. Lorsque cette étape a eu lieu les bactéries ne peuvent plus être sauvées par l'addition de trypsine.

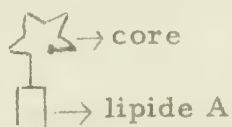
Cette étape pourrait être inhibée par l'action des serum anti-bactériens. Mme MAROTEL-SCHIRMAN (1968) a en effet mis en évidence une action protectrice de ces serums vis à vis des bactéries sensibles ayant fixé la colicine.

Cette étape irréversible n'est pas de même nature pour toutes les colicines.

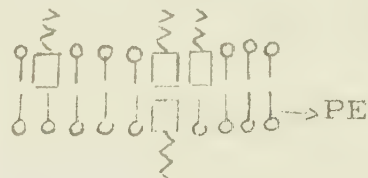
a) Colicines A, E1 et K.

La colicine fixée sur son récepteur interagit avec un deuxième récepteur qui peut être la partie KDO - lipide A du LPS pour les colicines A, E1 et K, mais pas pour la colicine E2 (MAROTEL-SCHIRMAN & BARBU, 1969). Le LPS étant distribué en assez grand nombre à la surface bactérienne, sa présence à côté du récepteur est fort probable. Leur rencontre pourrait également avoir lieu lors des mouvements de la membrane, dans la 2ème étape.

La partie du LPS avec lequel peuvent interagir les colicines est associée dans la membrane, avec des phospholipides et tout particulièrement avec la PE. En effet, ROTHFIELD et coll. (1968, 1969) ont démontré que le LPS ne peut être le substrat des transférases qui assurent sa synthèse que lorsqu'il est associé avec la PE. L'association PE-LPS provoque un changement d'état du LPS. Ces auteurs ont proposé un modèle pour expliquer ce phénomène



LPS isolé



LPS dans la membrane

On peut envisager que l'interaction de la colicine avec le LPS dans la fraction KDO-lipide A perturbe cette association

PE-LPS et change l'orientation des molécules lipidiques. La PE deviendrait accessible aux phospholipases bactériennes présentes dans la membrane (chap. V)

L'étape irréversible de l'action de la colicine aurait lieu dès l'interaction de la colicine avec le KDO-Lipide A. Ce serait l'action de la phospholipase A bactérienne. L'action de la phospholipase serait possible grâce au changement d'orientation des molécules de PE consécutive à l'interaction KDO-Lipide A. La trypsine ne pourrait pas détruire la phospholipase et arrêter ainsi son fonctionnement, car elle doit être inaccessible à cet enzyme exogène, étant localisée dans la membrane. Les produits sous cette forme : LPE et acides gras libres, peuvent jouer un rôle important dans la structure et le fonctionnement de la membrane et par là de la cellule.

b) Colicine E2

L'étape irréversible de l'action de la colicine E2 n'a lieu que très tardivement. Elle consisterait en une action indirecte de la colicine E2 sur l'initiateur de la réplication de l'ADN. La nature de celui-ci n'est pas connue. Les partisans d'un contrôle positif de la réplication de l'ADN (JACOB, BRENNER & LUZIN,) (1963), envisagent l'existence d'une protéine " initiateur " dont les sous unités sont fabriquées au cours de chaque génération; l'initiateur devient actif dès la fabrication de la dernière sous-unité et la réunion de toutes les sous-unités. Les partisans du contrôle négatif (ROSENBERG et coll. , 1969) envisagent au contraire la synthèse d'un représseur de réplication au début de chaque cycle de réplication et la synthèse continue d'un antirepresseur capable de complexer le représseur quand sa concentration est suffisante, c'est-à-dire à la fin du cycle de réplication. Cet antirepresseur serait une protéine de la membrane et serait composé de plusieurs sous-unités. La régulation de leurs synthèses serait assez complexe.

Deux hypothèses différentes dans lesquelles les phospholipides ont un rôle à jouer, peuvent être envisagées pour expliquer l'action de la colicine E2.

- 1) La colicine E2 empêcherait l'initiation de la réplication de l'ADN.

La colicine E2 agirait sur le métabolisme des phospholipides de telle façon que l'origine du DNA qui est accrochée à la membrane (RYTER et JACOB, 1966) et peut être ainsi en contact avec les lipides, ne puisse plus, être accessible à l'initiateur dans le cas du contrôle positif, ou ne puisse plus permettre la diffusion du represseur qui y est fixé vers l'anti-represseur qui, lui, étant dans la membrane ne peut diffuser, dans le cas du contrôle négatif.

BEREZIAT et BARBU (résultats non publiés) ont constaté que, lors de l'action de la colicine E2, le pourcentage des acides gras saturés des bactéries augmenté de 10% au dépend des acides gras insaturés. Le point de fusion des acides gras saturés est considérablement plus élevé que celui des acides gras insaturés. Aussi l'augmentation du taux des acides gras saturés doit provoquer une augmentation de la viscosité de la membrane. La diffusion des constituants de la membrane, la diffusion des protéines cytoplasmiques vers les constituants de la membrane seraient ralenties ou, dans certains cas, inhibées. L'amorce de l'action de la colicine E2 serait ainsi la transformation d'un enzyme du métabolisme des acides gras : inhibition d'une désaturase ou activation d'une saturase.

Mais la diffusion de l'initiateur ou du represseur de la réplication de l'ADN pourrait également être gênée par une synthèse accrue de phospholipides à un endroit privilégié de la membrane ou par un déplacement des phospholipides à cet endroit.

Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'induction du phage chez les bactéries lysogènes sensibles à la colicine E2. Le represseur de la réplication ne pouvant plus diffuser lors de l'action de cette colicine, la synthèse de l'antirepresseur continuerait. Le represseur du prophage (il n'est pas situé près de la membrane) diffuserait et se lierait à l'antirepresseur en excès, l'antirepresseur n'étant pas spécifique du represseur d'un réplicon donné.

- 2) La colicine E2 favoriserait l'initiation de la réplication de l'ADN.

La réplication de l'ADN ne serait plus en rapport avec la division cellulaire. Elle aurait lieu d'une façon désordonnée, avant que le cycle de réplication soit terminé.

PRITCHARD & LARK (1964) ont montré que la privation en thymine d'une souche thymine exigeante provoque l'induction du phage λ et l'initiation de nouveaux cycles de réplication. Ces deux phénomènes : induction et initiation sont liés dans ce cas. Une action analogue de la colicine E2 peut être envisagée. La synthèse de l'ADN serait maintenue et même accrue lors de l'action de cette colicine. Nous avons constaté que l'incorporation totale de ^{32}P chez les bactéries traitées avec 100 U. L. de colicine E2 est égale à celle des bactéries non traitées, pendant 30 à 50 mn d'incubation en milieu tryptose 5%, à 37°C.

L'amorce de l'action de la colicine E2 serait alors plus difficile à envisager. La colicine E2 pourrait provoquer des perturbations dans la régulation de l'endonucléase, enzyme qui précède l'action de la DNA - polymérase. Les lipides pourraient jouer un rôle dans cette régulation, l'endonucléase agissant sur l'origine du DNA, située près de la membrane.

Cette deuxième hypothèse expliquerait mieux l'absence d'augmentation du taux de DPG chez les bactéries traitées par la colicine E2, toutes les bactéries dont l'initiation de la réplication est inhibée ayant un taux élevé de DPG (chap. V).

4) Les étapes létales

Elles seraient la conséquence des transformations phospholipidiques. La structure de la membrane se trouve altérée et ses fonctions de contrôle perturbées.

En effet , les lipides jouent un rôle essentiel dans la structure de la membrane. Différents modèles ont été proposés pour expliquer ce rôle. Le plus ancien est celui de DANIELLI & DAWSON (1935) : les lipides seraient unis entre eux par des liaisons hydrophobes et formeraient une double couche entourée de part et d'autre par deux couches de protéines , la liaison protéine-lipide étant uniquement électrostatique. Selon BENSON (1966) les protéines seraient situées dans l'épaisseur de la membrane, les lipides étant liés à ces protéines d'une façon irrégulière par des liaisons hydrophobes. Selon GREEN et PERDUE (1966), la membrane est une association de sous unités lipoprotéiniques différentes, chaque sous unité ayant un rôle fonctionnel et un rôle structural, rôles dus à leur composition et aussi à leur

localisation dans la membrane. Des auteurs comme RAZIN et coll. (1965), BROWN (1965), ont isolé des sous unités lipo-protéiniques homogènes à partir de membranes. D'autres, YAMASHITA et RACKER (1968) ont montré que les enzymes de la membrane nécessitaient la présence de lipides : c'est le cas de la cytochrome-oxydase, de la succinodeshydrogénase. Ainsi les lipides ont un rôle structural, maintenant les protéines de la membrane dans un environnement donné, et un rôle fonctionnel car ils sont indispensables à l'activité de certains enzymes. La conformation des protéines peut dépendre de leur association avec les lipides. Certains substrats doivent être combinés aux lipides pour pouvoir être transformés. (C'est peut-être le cas de l'ADN dont la réplication ne pourrait être initiée que lorsque son origine est associée à des lipides ou, plus vraisemblablement à une lipoprotéine de composition lipidique bien définie).

a) Colicines A, E1 et K.

Lors de l'action de ces colicines , la diminution de la quantité de PE, l'augmentation de celle de LPE et la libération d'acides gras dues à l'activité des phospholipases A provoqueraient des perturbations dans l'association des molécules de membrane : lipide - lipide et lipide-protéine.

- La PE étant le phospholipide le plus abondant et le plus stable de E. coli, doit être indispensable pour maintenir la structure de la membrane. La diminution de son taux doit provoquer des modifications dans l'orientation des protéines et dans leur activité.

- La LPE peut avoir un effet détergent sur les lipides de la membrane, désorganisant ainsi les associations moléculaires. L'augmentation de son taux provoquerait les troubles de la perméabilité et la chute de densité optique des bactéries traitées par les colicines. Cette action serait comparable à celle observée par WALLACH (1969) : la formation ou l'addition de lysolécithine dans ou sur des cellules d'Erlich provoque une chute de densité optique de ces cellules et un changement de conformation de 30 à 35% des protéines de membrane , suivi d'une perte d'activité de ces protéines.

- La libération d'acides gras pourrait avoir des repercussions sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire. BORST et coll. (1962) ont démontré que l'adénosine-triphosphatase (ATPase) est stimulée par les acides gras, et principalement par les acides gras insaturés. Ces derniers agissent sur les oxydations phosphorylantes : ils inhibent ou freinent la formation d'ATP. Or, les acides gras insaturés sont libérés préférentiellement par les phospholipases A impliquées dans l'action des colicines.

L'augmentation du taux de DPG serait également une conséquence de l'action des phospholipases. Cette augmentation est due à une formation de DPG accrue à partir du P6 dans les 5 premières minutes de l'action des colicines, mais ensuite à l'arrêt de la dégradation du DPG. Les enzymes nécessaires à cette dégradation ne sont pas inactivés par la nouvelle composition lipidique de la membrane, car des substances autres que les colicines peuvent provoquer une augmentation du taux de DPG sans augmentation du taux de LPE (chap. V). L'augmentation du taux de DPG semble être une réaction de défense de la bactérie ; elle a lieu quelque soit la nature de l'agression dont est victime la bactérie. Ici l'agression est l'action de la phospholipase A déclenchée par les colicines. Le DPG, par ses propriétés physiques, particulièrement sa forte hydrophobie, doit modifier les interactions lipide-protéine et gêner le fonctionnement des enzymes de la membrane.

L'arrêt des synthèses macromoléculaires pourrait être la conséquence des troubles de perméation et de la chaîne respiratoire. L'ATP formé n'est plus en quantité suffisante pour assurer les synthèses, mais peut encore contribuer à l'oxydation de certains produits et au transport de quelques métabolites (FIELDS & LURIA, 1969). On sait (CASHEL & GALLANT, 1969) que chez les souches stringent, l'absence d'un acide aminé provoque l'expression du gène RC " stringent control " : il prévient la synthèse de l'ARN et des nucléosides triphosphates. L'expression d'un tel gène ou de gènes semblables pourrait avoir lieu à la suite des troubles de perméation de la bactérie.

S'il en était ainsi , toutes les substances provoquant l'augmentation des taux de LPE et de DPG devraient provoquer les mêmes troubles métaboliques que la colicine, c'est-à-dire que des agents aussi différents que le formol, les solvants , les antibiotiques et le complément auraient le même mode d'action. Tous ces agents sont létaux; l'augmentation simultanée des taux de LPE et de DPG est donc bien fatale pour la bactérie.

Cependant , les sphéroplastes présentent des taux élevés de DPG et de LPE (chap. III) et sont encore capables d'effectuer des synthèses, protéiques ou phospholipidiques, de consommer de l'oxygène , de concentrer certains substrats. Mais il est difficile de savoir si ce ne sont pas les sphéroplastes éclatés qui ont une concentration élevée de LPE. Les autres sphéroplastes auraient une concentration de LPE faible et une concentration élevée de DPG, le DPG apparaissant dans tous les cas d'agression de la membrane. Mais ceci est difficile à mettre en évidence ; nous avons cependant noté que , lors de la lyse par choc osmotique des sphéroplastes, il y a augmentation du taux de LPE.

b) Colicine E2.

L'étape létale de l'action de la colicine E2 est la dégradation de l'ADN (NOMURA, 1963). Nous avons donné (paragraphe 3) une hypothèse permettant d'expliquer l'induction du phage λ par la colicine E2.

Le fait que toutes les synthèses se poursuivent après la fixation de la colicine E2 de telle façon que la densité optique de la suspension bactérienne traitée continue de croître permet de penser que seul le mécanisme de la division bactérienne est altéré. Les synthèses ne sont plus régulées en accord avec la multiplication du chromosome. Le mode d'action de la colicine E2 est à rapprocher des perturbations métaboliques provoquées par le changement de température de 30 à 41° C par un mutant thermosensible isolé par HIROTA et coll. (1969). Ce mutant est viable à 30°C, mais non à 41°C. A 41°C, les synthèses d'ADN, d'ARN, de protéines et de phospholipides se poursuivent; les synthèses des phospholipides sont telles que le cytoplasme de la bactérie est envahi de structures lamellaires rappelant la membrane; cepen-

dant , il n'y a pas de multiplication bactérienne. La dégradation de l'ADN chez ce mutant n'a pas été examinée; il semble que l'inactivation des bactéries dépende des synthèses de certaines protéines.

Il pourrait en être de même pour la colicine E2, car l'addition de chloromycétine transforme son mode d'action. On ne peut interpréter le maintien important de la synthèse des phospholipides lors de l'action de la colicine E2 que comme un développement de la membrane. Un examen des bactéries traitées au microscope électronique permettrait une confirmation de cette hypothèse. Le développement de la membrane pourrait se faire à l'extérieur, mais aussi à l'intérieur de la cellule, perturbant son fonctionnement et isolant à l'intérieur des replis de la membrane des constituants cellulaires. Ainsi l'ADN ou une partie de l'ADN pourrait se trouver inaccessible aux réparases et ligases qui assurent son intégrité, et ainsi être dégradé.

0
0 0

L'action *primum movens* des colicines reste encore inexpliquée. Nous pensons que les lipides et tout particulièrement les phospholipides de la membrane bactérienne jouent un rôle capital dans le métabolisme de toute cellule , coordinant et régulant ses principales activités, et dans sa réponse ou dans sa lutte contre toutes les agressions. Comment une protéine spécifique peut-elle tuer une bactérie si bien défendue? L'étude de la membrane et du rôle des lipides dans les fonctions de la membrane permettra de l'élucider.

- CONCLUSIONS -

Les colicines se fixent et agissent à partir de la surface cellulaire. Leur mode d'action n'est pas connu dans tous ses détails.

Afin de pouvoir interpréter quantitativement l'action des colicines, nous avons mis au point deux nouvelles méthodes de dosage qui permettent une évaluation, en deux heures, du nombre d'unités létales contenues dans une préparation.

A l'aide de ces méthodes, nous avons déterminé le nombre d'unités létales (U. L.) de colicine que peut fixer au maximum une bactérie. Ce nombre est différent d'une colicine à l'autre : il est de 600 pour la colicine K et est voisin de l'unité pour la colicine A ; pour les autres colicines, ce nombre est compris entre ces deux valeurs extrêmes. La quantité de colicine qui peut se fixer sur une bactérie est donc limitée. Ce qui implique que l'affinité des colicines pour leur récepteur est très élevée et que l'association colicine-récepteur est très stable. La vitesse de fixation d'une colicine dépend directement du nombre de récepteurs dont la colicine dispose à la surface de la bactérie. Des colicines qui, comme la colicine A, disposant de peu de récepteurs se fixent très lentement. De ce fait, leur dosage ne peut se faire qu'avec de très fortes concentrations en bactéries.

L'action des colicines s'exerce à partir de récepteurs spécifiques, mais la spécificité du récepteur n'a aucune influence sur la

spécificité des actions biochimiques déclenchées par les colicines fixées ; en effet , les colicines E1, E2 et E3 provoquent à partir d'un même récepteur, des modifications différentes du métabolisme bactérien ; les colicines E1 et K provoquent , à partir de récepteurs différents , des modifications identiques du métabolisme bactérien. Ces derniers faits suggèrent l'existence de récepteurs primaires pour la fixation et de récepteurs secondaires pour l'action proprement dite.

Les colicines agissent selon une cinétique de coup unique , une seule molécule de colicine est virtuellement capable de déclencher les processus entraînant la mort de la bactérie. Ces processus ont nécessairement comme point de départ la surface bactérienne. Il est remarquable que l'action d'une molécule de colicine intéresse rapidement l'ensemble du métabolisme de la bactérie.

Nous avons étudié les modifications du métabolisme des phospholipides de la membrane de E. coli consécutives à la fixation des colicines.

Dès le début de l'action de certaines colicines A, E1, E3 , K, et Q, il y a une augmentation du taux de la lysophosphatidyléthanolamine (LPE) et une augmentation du taux de diphosphatidylglycérol (DPG). La LPE est formée à partir de la phosphatidyléthanolamine (PE) et de DPG à partir du phosphatidylglycérol (PG). Ces transformations font partie du métabolisme normal de la cellule ; lors de l'action des colicines, la formation de ces phospholipides est augmentée et la dégradation du DPG est diminuée.

L'étude des transformations des phospholipides en fonction du nombre d'unités létales fixées par bactérie montre qu'il suffit d'une U. L. pour provoquer les transformations décrites ci-dessus. En présence de plusieurs U. L., ces processus sont accélérés et amplifiés.

Les colicines A, E1, et K n'ont aucune action sur les phospholipides isolés. Elles provoquent l'activation de phospholipases et d'autres enzymes préexistants dans la bactérie. Ces enzymes peuvent être activés par divers facteurs agissant sur la membrane bactérienne ; solvants organiques, antibiotiques, dinitrophénol, formol, chauffage à une température supérieure à 48°C...

Lors de l'action des colicines A, E1, et K, la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides est fortement diminuée. Mais elle ne s'annule pas contrairement à l'incorporation de ^{32}P dans les acides nucléiques ou d'acides aminés dans les protéines (NOMURA et MAEDA, 1965).

L'action de ces colicines s'accompagne d'une modification de la perméabilité de la membrane cellulaire avec libération de constituants phosphorés dans le milieu de culture, et d'un arrêt de la respiration.

Consécutivement aux transformations des phospholipides et aux modifications de la perméabilité, il se produit une à trois heures après la fixation des colicines, une diminution de 60 à 70% de la densité optique des suspensions bactériennes. Cette diminution de densité optique est négligeable en milieu salin. Elle est favorisée par l'addition de divers produits qui, à eux seuls, n'ont pas une telle action : chloromycétine, 25 µg/ml, streptomycine 2 µg/ml, lysozyme 50 µg/ml, formol 0,06%....

Le mode d'action de la colicine E2 est différent de celui des colicines précédemment citées. Elle ne provoque aucune modification des taux des différents phospholipides et aucune diminution de la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides. Lors de son action, le turnover de composés phosphorés de faible poids moléculaire, contaminant les phospholipides est augmenté. Ces composés ont été isolés dans la phase aqueuse de l'extrait lipidique et n'ont pas été identifiés.

L'action de cette colicine n'est accompagnée ni d'un arrêt de la respiration ni de changement de la perméabilité, sauf en présence de chloromycétine. Selon NOMURA et MAEDA (1965), la colicine E2 ne provoque pas l'arrêt des synthèses des acides nucléiques et des protéines, mais la dégradation de l'ADN et l'induction du phage λ chez les bactéries lisogènes.

La sensibilité d'une bactérie à une colicine peut être influencée par divers facteurs : la phase de croissance , le taux de DPG, l'état de la membrane bactérienne , la température et la composition du milieu de culture , l'anaérobiose, . La sensibilité varie également selon la souche bactérienne utilisée. Chez les sphéroplastes , les modifications des phospholipides dues à la transformation des bactéries en sphéroplastes masquent celles éventuellement provoquées par les colicines.

Nous considérons l'arrêt des synthèses des acides nucléiques et des protéines, l'inhibition des oxydations phosphorylantes et la diminution importante de la synthèse de l'ATP lors de l'action des colicines A, E1, et K, comme étant des conséquences de la transformation des phospholipides de la membrane bactérienne. La colicine E2 agirait sur la régulation de la division bactérienne : elle pourrait altérer ou inhiber ou activer un produit de la membrane bactérienne nécessaire à l'initiation de la duplication de l'ADN.

- BIBLIOGRAPHIE -

- AMES, G. F. - 1968. Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* : structure and metabolism. *J. Bacteriol.*, 95, 833.
- BARBU, E. et LUX, M. - 1969. Transformation des phospholipides bactériens consécutive à l'action du complément. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 268, 449.
- BENSON, A. A. - 1966. On the orientation of lipids in chloroplast and cell membranes. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 43, 265.
- BEPPU, T. and ARIMA, K. - 1967. Protection of *Escherichia coli*, from lethal effect of colicin by high osmotic pressure. *J. Bacteriol.*, 93, 80.
- BEUMER, J., M. P. BEUMER-JOCKMANS, J. DIRKX et D. DEKEGEL - 1966. Localisation des récepteurs de phages chez les souches de *Shigella* et d'*Escherichia*. *Ann. Inst. Pasteur*, 5, 727.
- BLIGH, E. G. and W. J. DYER - 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911.
- BORDET P. et J. BEUMER. - 1948. Inhibition de l'action d'antibiotiques par des extraits des bactéries sensibles. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 142, 259.
- BORSTP., J. LOOS, E. CHRIST and E. SLATER. - 1962. Uncoupling activity of long chain fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 62, 509.
- BRINTON C. C. - 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram-negative bacteria. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 27, 1003.

- BROWN A. D. - 1965. Hydrogen ion titrations of intact and dissolved lipoprotein membranes. *J. Mol. Biol.*, 12, 491.
- CASH W. D. and M. GARDY. - 1965 Role of metal contaminants in the mitochondrial swelling activities of reduced and oxidized glutathion preparations. *J. Biol. Chem.* 240, 3450.
- CASHEL M. and J. GALLANT. - 1969. Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*, 221, 838.
- CAVARD D. et E. BARBU. - 1966. Quelques données sur la fixation des colicines. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 262, 1809.
- CAVARD D. et E. BARBU. - 1969. Diverses modifications du métabolisme de *E. coli* consécutives à l'action de la colicine E2. *C.R. Acad. Sc. Paris* 268, 1133.
- CAVARD D., J. POLONOWSKI et E. BARBU. - 1967. Modifications du métabolisme des phospholipides de *E. coli* consécutives à l'action de la colicine K. *C.R. Acad. Sc. Paris* 265, 1851.
- CAVARD D., C. RAMPINI, E. BARBU et J. POLONOWSKI/-1968. Activité phospholipasique et autres modifications du métabolisme des phospholipides consécutives à l'action des colicines sur *E. coli*. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 1455.
- CAVARD D., J. SCHIRMAN, M. LUX, C. RAMPINI et E. BARBU. - 1967. Action lytique des colicines. *C.R. Acad. Sc. Paris* 265, 1255.
- CHANGEUX J. P. et J. THIERY. - 1967. On the mode of action of colicins: a model of regulation at the membrane level. *J. Theoret. Biol.*, 17, 315.
- CLOWES R. C. - 1965. Transmission and elimination of colicin factors and some aspects of immunity to colicin E1 in *Escherichia coli*. *Zentr. Bakteriell. Parasitenk. Abt. I Orig.*, 196, 152.

- CRONAN J. E. - 1968. Phospholipides alterations during growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 95, 2054.
- DANDEU J. P. - 1969. Etude comparée des colicines E1, K, A, et Q. Thèse de doctorat de l'Université de Paris.
- DANDEU J. P. et E. BARBU - 1967a. Caractérisation immunochimique d'une bactériocine. C.R Acad.Sc. Paris 264, 173.
- DANDEU J. P. et E. BARBU - 1967b. Purification de la colicine K. C.R. Acad.Sc. Paris. 265. 774.
- DANDEU J. P. et E. BARBU - 1968. Etude comparée de quelques colicines. C.R. Acad. Sc. Paris, 266, 634.
- DANDEU J. P., A. BILLAULT et E. BARBU - 1969. Action des colicines sur la vitesse de sortie du potassium intracellulaire. C.R. Acad.Sc. Paris, 269, 2044.
- DANIELLI J. F. and H. DAWSON. - 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. J. Cellular Comp. Physiol., 5, 495.
- ENDO H., T. KAMIYA and M. ISHIZAWA. - 1963. λ phage induction by colicin E2. Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 477.
- FAGUET M. - 1967a. Sur l'inhibition de la croissance des cultures d'E. coli K12 par la colicine K et sur la levée de cette inhibition par la trypsine. Ann. Inst. Pasteur, 112, 369.
- FAGUET M. - 1967b. Sur l'action antibiotique comparée de quelques colicines. C.R. Acad. Sc. Paris, 265, 822.
- FIELDS K. L. and S. E. LURIA. - 1969. Effects of colicins E1 and K on transport systems. J. Bacteriol., 97, 57.
- FIELDS K. L. and S. E. LURIA. - 1969. Effects of colicine E1 and K on cellular metabolism. J. Bacteriol., 97, 64.
- FREDERICQ P. - 1946. Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose de E. coli. C.R. Soc. Biol. Paris, 140, 1189.

- FREDERICQ P. - 1948. Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. Rev. belge Path. 19, 1.
- FREDERICQ P. - 1949a. Sur la résistance croisée entre colicine E et bactériophage II. Compt. Rend. Soc. Biol. 143, 1011.
- FREDERICQ P. - 1949b. Sur la résistance croisée entre colicine K et bactériophage III. Compt. rend. Soc. Biol. 143, 1014.
- FREDERICQ P. - 1952 - Action bactéricide de la colicine K. C. R. Soc. Biol. Paris, 146, 1295.
- FREDERICQ P. - 1956. Résistance et immunité aux colicines. C. R. Soc. Biol. 150, 1514.
- FREDERICQ P. et G. DELCOUR. - 1953. Sur la cinétique de l'action bactéricide des colicines E et K. Compt. Rend. Soc. Biol. 147, 1310.
- FREDERICQ P. et A. GRATIA. - 1949. Résistance croisée à certaines colicines et à certains bactériophages. Compt. rend. Soc. Biol. 143, 560.
- FUJIMURA R. K. - 1966. Effect of colicine E2 on the biosynthesis of bacteriophage R 17. J. Mol. Biol. 17, 75.
- GALE E. F. and J. P. FOLKES. - 1967. The effect of lipids on the accumulation of certain amino acids by Staphylococcus aureus. Biochim. Biophys. Acta. 144, 461.
- GOEBEL W. F., G. T. BARRY and T. SHEDLOVSKY. - 1956. The production of colicine K in media maintained at constant pH. J. Exp. Med., 103, 577.
- GRATIA A. - 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. Compt. Rend. Soc. Biol., 93, 1040.
- GRATIA A. - 1932. Antagonisme bactérien et bactériophagie. Ann. Inst. Pasteur, 48, 413.

- GRATIA A. et P. FREDERICQ. - 1946. Diversité des souches antibiotiques de *E. coli* et étendue variable de leurs champs d'action. C.R. Soc. Biol. Paris, 140, 1032.
- GREEN D.E. and S. FLEISCHER. - 1963. The role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, 70, 554.
- GREEN D.E. and J.F. PERDUE - 1966. Membranes as expressions of repeating units. Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 55, 1295.
- GUTERMAN S.K. and S.E. LURIA. - 1969, *Escherichia coli* : strains that excrete an inhibitor of colicin B. Science, 164, 1414.
- HAMON Y. 1964. Les bactériocines. Ann. Inst. Pasteur, 107, 54.
- HAMON Y. et Y. PERON - 1966. Nouvelle classification des colicines appartenant au groupe E. Zentr. Bakteriell. Parasitenk. Abt. I. Orig., 200, 375.
- HEDGES A.J. - 1966. An examination of single-hit and multi-hit hypotheses in relation to the possible kinetics of colicin adsorption. J. Theoret. Biol., 11, 383.
- HERSCHMAN H.R. and D.R. HELINSKI. - 1967. Purification and characterization of colicin E2 and colicine E3. J. Biol. Chem. 242, 5360.
- HILL C. and I.B. HOLLAND. - 1967. Genetic basis of colicin E susceptibility in *Escherichia coli*. I. Isolation and properties of refractory mutants and the preliminary mapping of their mutations. J. Bacteriol., 94, 677.
- HINS DILL R.D. and W.F. GOEBEL. - 1964. The chemical nature of bacteriocins. Ann. Inst. Pasteur., 107, 54
- HIROTA Y., S. WAKIL, B. SHAPIRO, A. RYTER, J. HURWITZ et F. JACOB. - 1969, Sur un mutant thermosensible d'*Escherichia coli* présentant des anomalies de la membrane. C.R. Acad. Sc. Paris, 269, 1346.

- HOLLAND I. B. and E. J. Threlfall. - 1969. Identification of closely linked loci controlling ultra-violet sensitivity and refractivity to colicin E2 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 97., 91.
- IVANOVICS G., L. ALFOLDI and E. NAGY. - 1959. Mode of action of megacin. *J. Gen. Microbiol.*, 21, 51.
- JACOB F. - 1954. Les bactéries lysogènes et la notion de provirus. MASSON édit. Paris.
- JACOB F., S. BRENNER and F. CUZIN. - 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 329.
- JACOB F., L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. - 1952. Sur la biosynthèse d'une colicine et sur son mode d'action. *Ann. Inst. Pasteur.*, 83, 295.
- JACOB F. L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. - 1953. Comparaison entre la biosynthèse induite de la colicine et des bactériophages et entre leur mode d'action. *Ann. Inst. Pasteur*, 84, 313.
- KANEMASA Y., Y. AKAMATSU and S. NOJIMA. - 1967. Composition and turnover of the phospholipids in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, 144, 382. -
- KANFER J. N. and E. P. KENNEDY? - 1962. Synthesis of phosphatidylserine by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 237, PC. 270.
- KANFER J. N. and E. P. KENNEDY. - 1963. Metabolism and function of bacterial lipids. I. Metabolism of phospholipids in *Escherichia coli*. *B. J. Biol. Chem.* 238, 2919.
- KANFER J. N. and E. P. KENNEDY. 1964. Metabolism and function of bacterial lipids. II. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239, 1720.

- KATES M. - 1964. Bacteria lipids, *Advan. Lipid. Res.* 17,
- KNOX K.W., J. CULLEN et E. WORK. - 1967. An extracellular lipopolysaccharide phospholipidprotein complex produced by *Escherichia coli*. grown under lysine-limiting conditions. *Biochem. J.* 103, 192.
- KONISKY J. and M. NOMURA. - 1967. Interaction of colicins with bacterial cells. II. Specific alteration of *Escherichia coli* ribosomes induced by colicin E3 in vivo. *J. Mol. Biol.* 26, 181.
- LEIVE L. - 1965. A non specific increase in permeability in *Escherichia coli*. produced by EDTA. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.* 53, 745.
- LEVISOHN R., J. Konisky and M. NOMURA. - 1968. Interaction of colicins with bacterial cells. IV. Immunity breakdown studied with colicins Ia and Ib1. *J. Bacteriol.* 96, 811.
- LOSICK R. and Ph. W. ROBBINS. - 1969. The receptor site for a bacterial virus. *Sc. American*, 121,
- LURIA S.E. - 1964. On the mechanisms of action of colicins. *Ann. Inst. Pasteur.*, 107, 67.
- LWOFF A. - 1953. Lysogeny . *Bacteriol Rev.* 17, 269.
- MAEDA A. et M. NOMURA. - 1966. Interaction of colicins with bacterial cells. I. Studies with radioactive colicins. *J. Bacteriol.* 91, 685.
- Mc KNIGHT R. C., F. E. HUNTER Jr. and W. OEHLERT. - 1965. Mitochondrial membrane ghost produced by lipid peroxydation induced by ferrous ion. I. Production and general morphology. *J. Biol. Chem.*, 240, 3439.
- Mc KNIGHT R. C. and F. E. HUNTER Jr. - 1966. Mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous, ion. II. Composition and enzymatic activity. *J. Biol. chem.* 241, 2757.

- MAROTEL-SCHIRMANN J. - 1968. Etude sur les récepteurs bactériens des colicines. Diplôme d'études supérieures de sciences. Fac. Sc. Paris
- MAROTEL- SCHIRMANN J. et E. BARBU. - 1969. Quelques données sur les récepteurs des colicines. C.R. Acad. Sc. Paris, 269, 866.
- MAROTEL-SCHIRMANN J., D. CAVARD, L. SANDLER et E. BARBU 1970. Temps nécessaire à une colicine fixée sur une bactérie pour déclencher des processus irréversibles. C.R. Acad. Sc. Paris 270, 230.
- MAYR-HARTING A. -1964. The adsorption of colicin. J. Pathol. Bacteriol., 87, 255.
- MAYR-HARTING A. and C. SHIMELD. - 1965. Some observations on colicine receptors. Zentr. Bakteriell. Parasitenk. Abt. I. Orig., 196, 263.
- MITUSI E. and D. MIZUNO- 1969. Stabilisation of colicin E2 by bovine serum albumin. J. Bacteriol, 100, 1136.
- MONOD J. - 1942. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann, Edit. Paris.
- NAGEL de ZWAIG R. - 1969. Mode of action of colicin A. J. Bacteriol., 99, 913.
- NAGEL de ZWAIG R. and S. E. LURIA. - 1967. Genetic and physiological studies of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 94, 1112.
- NAGEL de ZWAIG R. and S. E. LURIA. - 1969. - New class of conditional colicin- tolerant mutants. J. Bacteriol., 99, 78.
- NEU H. C. and L. A. HEPPEL. -1965. The release of enzymes from *E. coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. J. Biol. Chem. 240, 3685.

- NOSE K. D. MIZUNO and H. OZEKI. - 1966. Degradation of ribosomal RNA from *Escherichia coli* induced by colicin E2. *Bioch. Biophys. Acta*, 119, 636.
- NOSSAL N. G. and L. A. HEPPEL. - 1966. The release of enzymes by osmotic shock from *E. coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.*, 241, 3055.
- NOMURA M. - 1963. Mode of action of colicins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 315.
- NOMURA M. - 1964. Mechanism of action of colicins. *Proc. Natl. Acad. Sc. U. S.*, 52, 1514.
- NOMURA M. and A. MAEDA. - 1965. Mechanism of action of colicins. *Zentr. Bakteriell Parasitenk. Abt. I. Orig.* 196, 216.
- NOMURA M. and M. NAKAMURA. - 1962. Reversibility of inhibition of nucleic acids and protein synthesis by colicin K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 306.
- NOMURA M. and C. WITTEN. - 1967. Interaction of colicins with bacterial cells. III. Colicin-tolerant mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 94, 1093.
- OKUYAMA H. and S. NOJIMA. - 1969. The presence of phospholipase A in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*. 176, 120.
- OZAKI M. Y. HIGASHI, H. SAITO, T. A. and T. AMANO. - 1966. Identity of megacin A with phospholipase A. *Biken J.*, 9, 201.
- PAYSANT M., M. BITRAN, J. ETIENNE et J. POLONOVSKI. - 1969. Phospholipase A du plasma sanguin de rat. Cinétique et propriétés. Existence d'un précurseur inactif. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51, 863.
- PRITCHARD R. H. and K. G. LARK. - 1964. Induction of replication by thymine starvation at the chromosome origin in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 9, 288.

- PROULX P.R. and L. L. M. van DEENEN. - 1966. Acylation of lysophosphoglycerides by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 591.
- PROULX P.R. and L. L. M. van DEENEN. - 1967. Phospholipase activities of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 144, 171.
- RAMPINI C. - 1969. Variations des phospholipides d'*E. coli* K12 après infection soit par le phage T2 soit par le phage T6. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 269, 2040.
- RAMPINI C., E. BARBU et J. POLONOVSKI. - 1970. Métabolisme du diphosphatidylglycérol d'*E. coli* K12 après l'arrêt, par incubation en milieu sans source d'énergie, du développement des bactéries. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 270, 882.
- RAMPINI C, M. LUX , D. CAVARD et E. BARBU. - 1969. Activation par chauffage d'enzymes bactériens agissant sur les phospholipides. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 268, 206.
- RAMPINIC, J. SCHIRMANN et E. BARBU. - 1967. Sélection par les colicines d'une classe particulière: de mutants thermosensibles d'*Escherichia coli*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 264, 1660.
- RANDLE C., Ph. ALBRO and J. DITTMER. - 1969. The phosphoglyceride composition of gram-negative bacteria and the changes in composition during growth. *Biochim. Biophys. Acta* 187, 214.
- RAZIN S. H. J. MOROWITZ and T. M. TERRY. - 1965. Membrane subunits of *mycoplasma laidlawii* and their assembly to membranelike structures, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 54, 219.
- REEVES P. - 1968. Mode of action of colicins of types E1, E2, E3 and K. *J. Bacteriol.*, 96, 1700.
- REYNOLDS B. L. and P. R. REEVES. - 1963. Some observations on the mode of action of colicin F. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 11, 140.

- REYNOLDS B. L. and P. R. REEVES. - 1969. Kinetics of absorption of colicin CA 42 E2 and reversal of its bactericidal activity. *J. Bacteriol.*, 100, 301.
- ROSENBERG B. H., L. F. CAVALIERI and G. UNGERS. - 1969. The negative control mechanism for *E. coli* DNA replication. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 63, 1410.
- ROTHFIELDS L. and A. FINKELSTEIN. - 1968. Membrane biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 675.
- ROTHFIELDS L., M. WEISER and A. ENDO. - 1969. Dissociation and reassociation of bacterial membrane components. *J. Gen. Phys.*, 54, 27.
- RYTER A. et F. JACOB. - 1966. Etude morphologique de la liaison du noyau à la membrane chez *E. coli* et chez les protoplastes de *B. subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur.*, 110, 801.
- SHANNON R. and A. J. HEDGES. - 1967. Kinetics of lethal adsorption of colicine E2 by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 93, 1353.
- SLEIN M. W. and G. F. LOGAN Jr. - 1967. Lysis of *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate and phospholipases as measured by β galactosidase activity. *J. Bacteriol.*, 94, 934.
- STANACEV N. Z., Y. Y. CHANG and E. P. KENNEDY. - 1967. Biosynthesis of cardiolipin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 242, 3018.
- UMBREIT W. W., R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER. - 1964. *Manometric technique*. Burgess Publishing Company Minn.
- van DEENEN L. L. M. - 1965. Phospholipids and biomembranes. In *Progress in chemistry of fats and lipids*. Cambridge, England, 8, 1.
- WALLACH D. F. - 1969. Membrane lipids and the conformations of

membrane protein. J. Gen. Physiol. 54, 3.

WEIDEL W. and H. PELZER. - 1964. Bagshaped macromolecules.
A new outlook on bacterial cell walls. Advan. in enzym., 26
193.

YAMASHITA S. and E. RACKER. - 1968. Reconstitution of the
mitochondrial oxidation chain from individual components.
J. Biol. Chem, 243, 2446.

TABLE des MATIERES

	PAGE
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - Matériel et Méthodes	5
sous-chapitre : Méthodes de dosage des colicines	7
CHAPITRE II - Etude de la fixation des colicines A, E et K.	20
I- Etude de la réversibilité de la fixation des colicines	21
II- Etude de la saturation des récepteurs en colicine	24
III- Etude de la vitesse de fixation des colicines	33
CHAPITRE III - Modifications du métabolisme des phospholipides bactériens lors de l'action des colicines	36
I - Devenir des phospholipides des bactéries sensibles soumises à l'action des colicines	39
II - Synthèse des phospholipides par des bactéries sensibles ayant fixé des colicines	46
III- Modifications du métabolisme des phospho- lipides des sphéropastes sous l'action des colicines	53
CHAPITRE IV - Observations sur des métabolites phosphorés entraînés avec les phospholipides lors de l'extraction par le méthanol-chloroforme	65

I- Radioactivité des métabolites phosphorés extraits avec les phospholipides bactériens en fonction de la technique de marquage au ^{32}P de bactéries	65
II- Essais de caractérisation et de purification des métabolites phosphorés entraînés lors de l'extraction des lipides bactériens	67
CHAPITRE V - Etude des phospholipides de E. coli après traitements des bactéries par différents agents	71
I- agents chimiques	71
II- agents physiques	76
CHAPITRE VI - Modifications de la perméabilité et de la respiration des bactéries sensibles lors de l'action des colicines	81
I- Perméabilité	82
II- Respiration	85
CHAPITRE VII - Influence de divers agents physiques et chimiques sur l'action des colicines	89
I- Anaérobiose	90
II- Antioxydants et métaux divalents	91
III- Recherche des peroxydes	92
IV- Choc osmotique	92
DISCUSSION -	95
I- Fixation des colicines	95
II- Processus biochimiques déclenchés par les colicines	103
III- Modèle d'action des colicines	109
CONCLUSIONS	120
Bibliographie	124

Vu et approuvé

Paris, le ...11 JANVIER.... 1971...

Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

L. GAUTHIER

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLIET

